

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y  
CUANTITATIVO DEL PAPEL DE LOS  
MACRÓFAGOS Y MASTOCITOS EN PRÓSTATA  
NORMAL Y PATOLÓGICA**

**TESIS DOCTORAL**

**ALMUDENA COLOMA DEL PESO**

**Madrid, 2015**



**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Cirugía**

D. **Luis Santamaría Solís**, Catedrático de Histología del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y D. **Fernando Teba del Pino**, Médico Adjunto del Servicio de Urología del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que Dña. **Almudena Coloma del Peso** ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada: ““Estudio inmunohistoquímico y cuantitativo del papel de los macrófagos y mastocitos en próstata normal y patológica”, y que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Medicina.

Madrid, 15 de Abril de 2015

Fdo: Prof. Luis Santamaría Solís

Dr. Fernando Teba del Pino

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO DE LA UAM

*Al Dr. Herrero,  
mi mentor,  
mi inspiración,  
mi meta.*

## AGRADECIMIENTOS

---

Gracias a mis directores, Dr. Santamaría y Dr. Teba, por mantener la fe en mí incluso en mis momentos bajos y darme espacio cuando lo necesitaba. Gracias por entender mis prisas y mis pausas. Gracias, porque sin vosotros este trabajo no estaría terminado.

Gracias a mi madre, que con su apoyo y orgullo incondicional me estimulaba para no abandonar y me dio la educación que me permitió llegar donde estoy.

Gracias a mi hermana Coti, que generosamente encontró tiempo entre sus labores de madre para diseñar las imágenes que necesitaba y cederme sus derechos de autor para poder ilustrar mi trabajo.

Gracias a mis amigas, Elena, Paloma, Muriel y Estefanía, que tuvieron paciencia durante años cuando les hacía reorganizar todas nuestras citas en torno a mis momentos de trabajo. En particular a las tres primeras, que siempre escucharon con interés mis historias de laboratorio sin entender absolutamente nada de lo que les contaba.

Gracias a Gloria, cuyo ejemplo me sirvió de guía e impulso en los momentos de desánimo y desesperanza.

Por último, gracias a todos aquellos que nunca creyeron que terminaría este proyecto e intentaron cambiar mi rumbo, porque fueron un estímulo casi tan fuerte como los que nunca dudaron de mi empeño.

## ÍNDICE

---

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1. GENERALIDADES.	10
2. GLÁNDULA PROSTÁTICA:	11
2.1 Desarrollo embriológico.	11
2.2 Anatomía y estructura histológica.	11
2.3 Fisiología.	14
2.4 Patología prostática.	15
3. LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS:	17
3.1 Monocitos.	17
3.2 Macrófagos tisulares y circulantes.	18
3.3 Linfocitos.	19
3.4 Células cebadas.	20
4. PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA PATOLOGÍA INFLAMATORIA Y TUMORAL.	22
5. ANGIOGÉNESIS EN LA PATOLOGÍA INFLAMATORIA Y TUMORAL.	23
6. PAPEL DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS EN LA INFLAMACIÓN CRÓNICA.	24
6.1 Los macrófagos y la inflamación crónica.	25
6.2 Las células cebadas y la inflamación crónica.	26

7. PAPEL DE CÉLULAS INFLAMATORIAS EN LA PATOLOGÍA TUMORAL.	27
7.1 Los macrófagos asociados a tumores (TAMs).	28
7.2 Las células cebadas en la patología tumoral.	30
8. HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA:	33
8.1 Fisiopatología.	33
8.2 Las células inflamatorias en la hiperplasia benigna de próstata.	34
8.3 Proliferación celular y angiogénesis en la hiperplasia benigna de próstata.	36
9. ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA:	36
9.1 Fisiopatología.	36
9.2 Las células inflamatorias en el adenocarcinoma de próstata.	38
9.3 Proliferación celular y angiogénesis en el adenocarcinoma de próstata.	41
10. EL MÉTODO ESTEREOLÓGICO: APORTACIONES AL ESTUDIO CUANTITATIVO.	43
10.1 El método estereológico: principios básicos.	43
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.	46
2. OBJETIVOS.	46
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
1. MATERIAL.	48
1.1 Determinaciones volumétricas en próstatas control (ctrl).	51
1.2 Determinaciones volumétricas en hiperplasia prostática (hbp).	51
1.3 Determinaciones volumétricas en próstatas con cáncer (Ca).	51



2. METODOLOGÍA HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA.	52
3. METODOLOGÍA CUANTITATIVA: ESTIMACIONES ESTEREOLOGICAS.	55
3.1 Determinación estereológica de la densidad de longitud de vasos sanguíneos en próstatas patológicas y controles.	57
3.2 Determinación estereológica de la densidad numérica de macrófagos y mastocitos en próstata patológicas y controles.	57
3.3 Determinación estereológica del índice de marcaje de PCNA en próstatas patológicas y controles.	58
3.4 Determinación estereológica de la fracción de volumen y volumen celular promedio de macrófagos en próstatas patológicas y controles.	59
3.5 Determinación estereológica de parámetros absolutos de longitud de vasos sanguíneos y número de macrófagos, mastocitos y células epiteliales en próstatas patológicas y controles.	60
4. ESTADÍSTICA.	60
4.1 Tablas de contingencia.	60
4.2 Análisis de la varianza (ANOVA).	61
4.3 Correlación de Pearson.	61
4.4 Análisis de conglomerados.	61
5. FOTOGRAFÍA.	63
<b>RESULTADOS</b>	<b>64</b>
1. HISTOLOGÍA CONVENCIONAL.	65
1.1 Próstata control.	65
1.2 Hiperplasia de próstata.	66
1.3 Adenocarcinoma prostático.	67
2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.	68
2.1 Inmunotinción proliferación celular.	68
2.2 Inmunotinción microvasos.	71

2.3 Inmunotinción macrófagos.	74
2.4 Inmunotinción mastocitos.	77
3. ESTUDIO CUANTITATIVO.	80
3.1 Tablas de contingencia.	80
3.2 Análisis de la varianza.	86
3.3 Estudio de correlación de variables.	98
3.4 Análisis de conglomerados.	110
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>124</u>
1. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.	125
2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS.	126
3. ESTUDIO CUANTITATIVO.	129
4. ESTUDIO DE CORRELACIÓN.	133
5. ESTUDIO DE CONGLOMERADOS.	135
5.1 Según grupos de estudio (control, hiperplasia y cáncer).	135
5.2 Según benignidad/malignidad.	136
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>137</u>
<u>RESUMEN</u>	<u>140</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>144</u>
<u>APÉNDICE</u>	<u>157</u>

# INTRODUCCIÓN

---

## **1. GENERALIDADES.**

La patología prostática tanto benigna como maligna, posee una importante prevalencia e incidencia en nuestro medio, representando unas de las principales causas de consulta en urología. Así, en España, los síntomas del tracto urinario inferior secundarios a la hipertrofia benigna de próstata aparecen en aproximadamente el 20-30% de la población masculina española mayor de 50 años (1), mientras que el cáncer de próstata alcanza una incidencia de 70 casos por cada 100.000 varones en nuestro país (2). Los recursos empleados para el diagnóstico y tratamiento de ambas enfermedades son enormes y presentan un ascenso paulatino. Es por ello que el estudio de estas patologías continúa activo tanto en el ámbito clínico como en el de investigación básica, con el fin de reconocer sus patrones fisiopatológicos y la repercusión clínica en los pacientes.

Algunos estudios, pretenden evaluar el papel de las células inflamatorias en la progresión y mantenimiento de estas enfermedades, buscando un nuevo objetivo para su tratamiento (3). En concreto, en el adenocarcinoma prostático, numerosos trabajos tratan de valorar y cuantificar la presencia y distribución de macrófagos y células cebadas, así como su repercusión sobre el pronóstico clínico (4,5). Estos estudios pretenden como último objetivo la obtención de una herramienta más que permita estratificar los pacientes de acuerdo a su pronóstico, y poder realizar un tratamiento ajustado según la agresividad tumoral, y la de poder explorar nuevas vías de tratamiento aparte de las conocidas.

El propósito de este trabajo es estudiar de forma cuantitativa la presencia y distribución de macrófagos y células cebadas en próstatas normales y patológicas, así como su relación con los procesos de angiogénesis y proliferación celular, propios de estas patologías.

## **2. LA GLÁNDULA PROSTÁTICA:**

### **2.1 Embriología y desarrollo de la próstata:**

La próstata tiene su origen embriológico en el seno urogenital, y se desarrolla mediante la evaginación del epitelio endodérmico de la uretra en el mesénquima circundante (6). Los conductos mesonéfricos o de Wolff, de origen mesodérmico, la atraviesan y desembocan en el veru montanum de la uretra, formando los conductos deferentes, las vesículas seminales y los conductos eyaculadores, así como el propio veru montanum, y parte de las glándulas acinares de la región central (7).

La diferenciación del tejido prostático se inicia en la séptima semana postconcepción y se completa entre la undécima y decimotercera semanas. A partir de la 24 semana de gestación se empiezan a desarrollar las luces glandulares y al final de la gestación algunos acinos están tapizados por epitelio cilíndrico alto. Los andrógenos fetales son los principales inductores y reguladores del crecimiento y desarrollo prenatal de la próstata (8).

Durante los primeros años de vida las células prostáticas carecen de capacidad secretora. A partir de los 12 años de edad, se produce un gran incremento en el número de acinos, prolongándose hasta la pubertad. Durante ésta, la estimulación hormonal produce un agrandamiento de las yemas y conductos glandulares y hay evidencia de actividad secretora. La glándula prostática alcanza su tamaño adulto a los 20 años de edad, momento precedido de una fase de crecimiento exponencial, con un tiempo de duplicación del peso prostático de 2,8 años (9).

### **2.2 Anatomía y estructura histológica:**

La próstata es un órgano impar que forma parte del sistema reproductor masculino y se encuentra distalmente a la vejiga rodeando la uretra en su porción proximal. En condiciones normales, tiene la forma y el tamaño aproximado de una castaña, un peso de unos 20 gramos

y unas dimensiones medias de 3,4 cm en el eje longitudinal, 4,4 cm en el transversal, y 2,6 cm en el anteroposterior.

Su base está íntimamente relacionada con el cuello de la vejiga, y su vértice en contacto con el suelo del periné. Su cara anterior se localiza posterior al pubis y la posterior, que se encuentra dividida en dos lóbulos por una escotadura, está en contacto con las vesículas seminales, y separada del recto por el tabique rectovesical. Las caras inferolaterales están recubiertas por una lámina conjuntiva que comprende en su espesor las venas de la parte lateral del plexo prostático, denominada fascia prostática.

La vascularización arterial proviene de ramas prostáticas de la arteria vesical inferior y de la arteria rectal media, que a su vez tienen su origen en la arteria hipogástrica. Su drenaje venoso es recogido por los plexos venosos prostáticos posterolaterales y el plexo prostático anterolateral (plexo de Santorini), cuya sangre es conducida a la vena ilíaca interna por las venas vesicales.

El drenaje linfático forma en la superficie de la próstata una red periprostática que desemboca en cuatro pedículos que drenan en ganglios sacros, ilíacos internos e ilíacos externos.

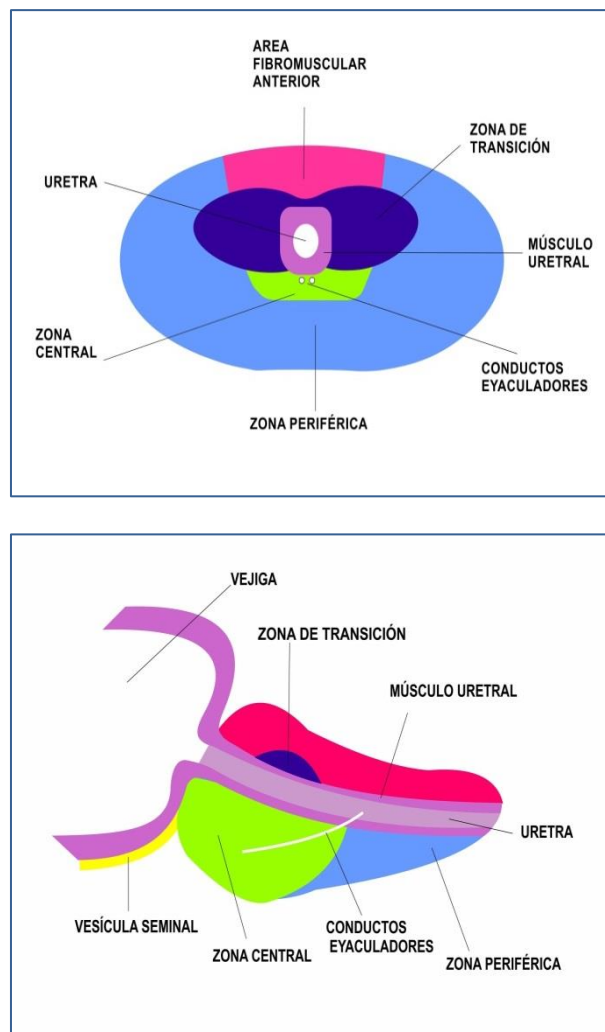
Su inervación proviene del plexo hipogástrico inferior, con fibras pertenecientes al sistema nervioso autónomo simpático, y de los nervios espláncnicos de la pelvis, con fibras del sistema nervioso parasimpático (10).

Posee una cápsula que la rodea constituida por tejido conjuntivo denso y células musculares lisas, aunque en determinadas zonas como el ápex prostático y la entrada de los conductos eyaculadores, es difícil identificarla como una entidad aparte (11). Se divide en dos porciones, glandular (50-70%) y fibromuscular (30-50%). La cara anterior de la próstata se compone en su mayor parte por estroma fibromuscular, mientras que los lóbulos laterales y la región posterior se encuentra compuesta fundamentalmente por tejido glandular.

El tejido prostático está constituido por 30 a 50 glándulas tubuloacinares inmersas en un estroma de células musculares lisas, fibroblastos y colágeno, que desembocan en la uretra prostática lateralmente al colículo seminal. La estructura histológica de los acinos y los conductos es idéntica, de forma que toda su estructura se dedica a la secreción. Estas glándulas tubuloacinares poseen importantes diferencias en cuanto a su longitud, dilatación y ramificación. Su superficie se encuentra replegada, con la finalidad de almacenar la secreción,

y está tapizada por un epitelio de células secretoras columnares, células basales y células neuroendocrinas que se encuentran sobre una lámina propia fibrosa (12).

Desde que en 1968 *McNeal* describiese su división de la glándula prostática en 3 zonas, (Figs. 1 y 2) se han realizado diversos estudios sin que fuese posible identificar claras diferencias histológicas y funcionales entre ellas. A pesar de ello, la división de la próstata según este patrón, está ampliamente difundida por su utilidad clínica. Según *McNeal* (13), la próstata se divide en una zona central, que rodea los conductos eyaculadores, una zona transicional, que rodea la uretra, y una zona periférica. La importancia clínica de esta división radica en que se ha observado que aproximadamente el 70-75% de los carcinomas prostáticos asientan en la zona periférica, mientras que la hiperplasia benigna de próstata ocurre principalmente debido a la hipertrofia de las glándulas de la zona transicional. Así mismo, la zona central parece ser resistente a la aparición de estas patologías (14).



**Figuras 1 y 2.** Secciones transversal (1) y sagital (2) de la próstata que muestran las diferentes zonas descritas por McNeal.

### **2.3 Fisiología prostática:**

La próstata es una glándula anficrina cuya función es la secreción del fluido que, unido al de las vesículas seminales, se encargará de la homeostasis de los espermatozoides en el eyaculado, así como de la producción de sustancias que intervienen en el crecimiento, la diferenciación y la actividad secretora propia.

Posee una secreción exocrina formada por un líquido alcalino claro de aspecto lechoso que contiene ácido cítrico, calcio, sodio, potasio, zinc, colesterol, fosfolípidos, carnitina, fosfatasa ácida prostática, espermina, antígeno prostático específico, fibrinogenasa y profibrinolisisina y otras proteasas. La función de estos compuestos no está claramente establecida, aunque parece que intervienen en procesos como la modificación del pH y la licuefacción del semen para mejorar la motilidad de los espermatozoides (15).

Durante la eyaculación, la cápsula de la glándula prostática se contrae de manera simultánea a las contracciones del conducto deferente y vesículas seminales, de manera que el líquido se une al semen, y es expulsado a la uretra.

La secreción autocrina, paracrina y endocrina de la próstata se produce fundamentalmente por las células neuroendocrinas, las células basales del epitelio glandular y las células estromales.

Tanto las células basales como las estromales son capaces de sintetizar y liberar dehidrotestosterona, un derivado de la testosterona que se produce por medio de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, cuya afinidad por el receptor androgénico es tres veces superior a la de la testosterona y que interviene en procesos de diferenciación y crecimiento prostático, así como en el desarrollo de patologías como la hiperplasia benigna de próstata y el adenocarcinoma (15).

Las células neuroendocrinas producen polipéptidos hormonales y aminas en respuesta a estímulos nerviosos del sistema nervioso autónomo. Estas sustancias neuroendocrinas, tales como serotonina, enolasa neuronal específica, somatostatina, sinaptofisina, péptido TSH-like, péptido PTH-like o bombesina, ejercen su función modulando el crecimiento, diferenciación y secreción del epitelio tanto en la próstata normal como en condiciones patológicas (15).



## 2.4 Patología prostática:

La patología prostática más frecuente es la **hiperplasia benigna de próstata**, y su incidencia está directamente relacionada con la edad, de forma que a los 60 años casi el 50% de los varones muestran signos histológicos de hiperplasia, y a los 90 años más del 80 % (16).

La hiperplasia benigna de próstata se caracteriza histológicamente por la proliferación de elementos epiteliales glandulares y estromales, lo que produce un aumento del tamaño de las glándulas y del volumen prostático. Dichos cambios se originan fundamentalmente en la región transicional y en las glándulas periuretrales. Las glándulas hiperplásicas están revestidas por células epiteliales altas cilíndricas y una capa periférica de células basales aplanadas (17).

Dicha hiperplasia puede afectar predominantemente a las glándulas, al estroma o ambos, pudiendo dar lugar a diferentes patrones histológicos. La hiperplasia estromal consiste en la proliferación nodular de fibroblastos y una ausencia casi total de glándulas. La hiperplasia glandular se caracteriza por una proliferación ductal y glandular con múltiples ramificaciones arborescentes, con la posibilidad de dilatación quística de las glándulas y atrofia del epitelio o la formación de cuerpos amiláceos como consecuencia de la producción de material PAS + por las células epiteliales y su calcificación secundaria (18).

El **adenocarcinoma prostático** es el tumor más frecuente en el varón, siendo el adenocarcinoma acinar el tumor más frecuente de la próstata, que representa el 90-95% de los carcinomas prostáticos. También es posible identificar otros subtipos histológicos mucho menos frecuentes, entre los que se encuentran el adenocarcinoma ductal, el carcinoma endometriode, el carcinoma neuroendocrino, el adenocarcinoma mucinoso, el carcinoma de células pequeñas, el carcinoma transicional, el carcinoma escamoso y tumores de origen no epitelial como el rabdomiosarcoma o los sarcomas. En general, todos ellos poseen un peor pronóstico y respuesta al tratamiento que el adenocarcinoma prostático acinar (19).

Son muchos los investigadores que han tratado de desarrollar clasificaciones histológicas que puedan predecir la evolución del tumor correlacionando el grado histológico del mismo con los datos de supervivencia. Las clasificaciones de *Gleason* (20) y *Brawn* (21) están basadas en el grado de diferenciación glandular, mientras que las clasificaciones de *Mostofi* (22), *Gaeta* (23) y *Böcking* (24) consideran también el grado de anaplasia celular en la tipificación microscópica de los adenocarcinomas. El patrón más usado actualmente es el establecido por *Gleason* y se usa como clasificación de referencia con el fin de conseguir criterios histológicos uniformes (25).

El sistema de Gleason valora el grado de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento del tumor, sin tener en cuenta las características citológicas del mismo (20) (26). Esta clasificación reconoce cinco patrones histológicos diferentes (fig. 3):

- Patrón 1: el tumor está constituido por glándulas redondas y ovaladas uniformes, separadas entre sí por escaso estroma. Las glándulas forman masas circunscritas bien delimitadas del parénquima tumoral.
- Patrón 2: las glándulas tumorales están bien diferenciadas, con variaciones en el tamaño y la forma, y con mayor cantidad de estroma que en el patrón 1. Los márgenes del tumor son más imprecisos, pero sin infiltración del estroma por glándulas abortivas o células sueltas.
- Patrón 3: incluye dos categorías histológicas diferentes que suelen aparecer entremezcladas en un mismo caso; a) glándulas pequeñas, medianas o grandes, separadas entre sí por estroma abundante, con límites imprecisos y con infiltración del estroma por pequeñas glándulas abortivas, b) masas cribiformes-papilares netamente delimitadas.
- Patrón 4: constituido por masas irregulares de glándulas fusionadas, coalescentes y ramificadas o nidos cribiformes grandes y mal delimitados. Pueden verse grandes masas de células claras y poligonales que recuerdan al adenocarcinoma de riñón. El tumor es difuso e infiltra el estroma.
- Patrón 5: No existe diferenciación glandular o ésta es mínima. Las células tumorales se disponen en cordones y trabéculas o constituyen masas sólidas, con infiltración del estroma por cordones o células sueltas. Se incluyen también los tumores formados por nidos sólidos, cribiformes o papilares con necrosis central.



**Figura 3.** Esquema representativo de la gradación histológica del adenocarcinoma de próstata según Gleason.

*Gleason* observó que en más de la mitad de los pacientes, los tumores presentaban dos patrones histológicos, un patrón predominante, que constituye más del 50% del tumor y que se denomina patrón primario, y un patrón secundario que ocupa un área menos extensa del tumor. *Gleason* sugirió que en cada caso los dos patrones histológicos deben ser identificados con dos dígitos diferentes. La suma de los dos patrones da lugar a una puntuación histológica que va del 2 al 10. En los casos en los que el tumor sólo presenta un patrón arquitectural, éste debe ser duplicado para obtener la puntuación histológica de dicho tumor (26).

### **3. LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS:**

Existen numerosas células que intervienen en la respuesta inflamatoria que se produce en el cuerpo humano de forma secundaria a una agresión, bien por agentes externos, bien por agentes internos. Estas células no actúan de manera individualizada, sino que trabajan de forma coordinada, interactuando entre ellas y modulando su actividad.

#### **3.1 Los monocitos:**

Constituyen del 3 al 8% de los leucocitos circulantes. Son células esféricas, con un núcleo redondo o reniforme desplazado hacia la periferia y uno o dos nucléolos. Su citoplasma se tiñe de una tonalidad azulada con la tinción de Giemsa, y contiene algunos gránulos azurófilos.

Se originan en la médula ósea y circulan en la sangre durante uno o dos días. Posteriormente, migran a través de las paredes de las vénulas postcapilares hasta el tejido conjuntivo de los diferentes órganos, formando los llamados macrófagos tisulares. No realizan ninguna función esencial, salvo la de representar una reserva móvil de células para la formación de macrófagos, por lo que podrían ser denominados *macrófagos circulantes*.

Recientes estudios parecen avalar la teoría de que los macrófagos tisulares también pueden originarse a partir de células del saco vitelino, del hígado fetal, y de stem cells (27).

Una vez que los monocitos salen de los vasos, adoptan diferentes características tintoriales en función del tejido en el que se encuentran, pero conservan marcadores

específicos de superficie comunes que permiten identificarlos, formando el llamado *sistema mononuclear fagocítico* (28).

### **3.2 Los macrófagos tisulares:**

Los macrófagos tisulares o *histiocitos* son una población de células móviles que se encuentran en los tejidos y que poseen una importante capacidad de fagocitosis, siendo los encargados de ingerir las células muertas y sus restos, así como bacterias y otras partículas, y proceder a su digestión por medio de los lisosomas. Así mismo, participan en el procesamiento de los antígenos y la exposición de éstos a los linfocitos para la creación de anticuerpos. Su ciclo vital es de aproximadamente 2 meses, y su reposición se lleva a cabo de forma lenta y continua por los monocitos de la sangre (29).

En función de su actividad se ha clasificado a los macrófagos en tres tipos diferentes. Los *macrófagos residentes*, que son los que se encuentran en los tejidos sin haber recibido ningún estímulo exógeno, los *macrófagos provocados*, aquellos que han sido movilizados en respuesta a un estímulo, y los *macrófagos activados*, que aumentan su capacidad de fagocitosis y de procesamiento del antígeno en respuesta a un estímulo local. Estas denominaciones hacen referencia a las distintas fases del proceso de respuesta inflamatoria (29).

Los macrófagos residentes son células fusiformes o estrelladas que se encuentran distribuidas en el tejido conjuntivo, y en mayor medida junto a los vasos de pequeño calibre. Poseen un núcleo pequeño e hipercromático, y un citoplasma heterogéneo con vacuolas y gránulos densos.

Los macrófagos provocados y activados poseen múltiples formas, con prolongaciones de su membrana como los pseudópodos, las microvellosidades o los lamelipodios. En su citoplasma se encuentran fagosomas, producto de la intensa actividad fagocítica, que posteriormente se fusionarán con los lisosomas para proceder a su digestión.

Así mismo, una vez activados por los liposacáridos bacterianos y el interferón  $\gamma$  producido por los linfocitos T, además de procesar y exponer el antígeno a los linfocitos B, producen numerosas sustancias tales como interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), iniciando una respuesta inflamatoria coordinada del sistema inmunitario.

### 3.3 Los linfocitos:

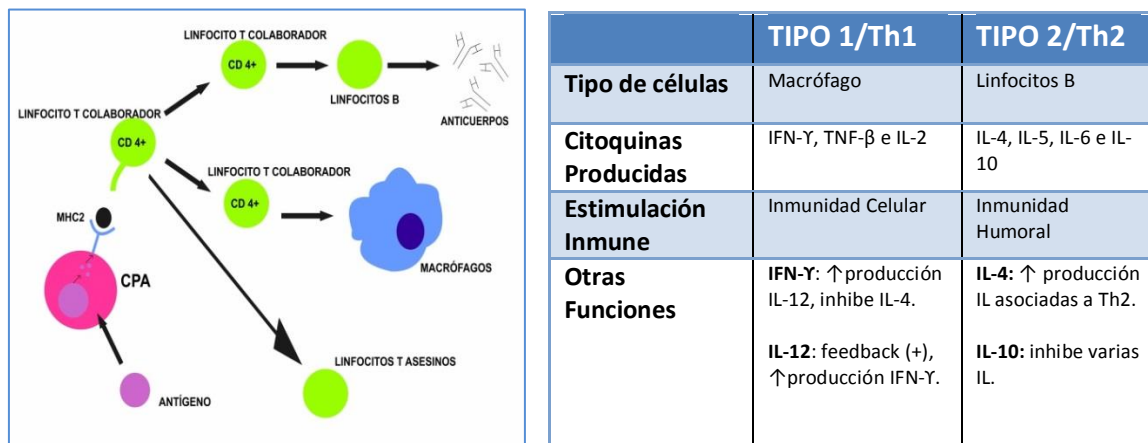
Los linfocitos son una familia de células caracterizadas por la presencia de un núcleo redondo y central que ocupa la mayor parte del espacio intracelular y un citoplasma basófilo que carece de gránulos específicos. Son fisiológicamente heterogéneos, teniendo la capacidad de reconocer diferentes antígenos, así como de distinguirse por su capacidad funcional, la duración de su vida y su sensibilidad a diferentes estímulos. Se encuentran de forma difusa en la sangre y el tejido conjuntivo, y en mayor concentración en el timo, el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas (30).

Los linfocitos T y B tienen el mismo aspecto, pero difieren en su distribución y su función inmunitaria. Para poder distinguirlos se usan técnicas inmunocitoquímicas basadas en las moléculas de su membrana.

- Los **linfocitos B** se identifican gracias a las moléculas de IgM o IgD de su superficie y son las células efectoras de la respuesta inmunitaria humoral.
- Los **linfocitos T** poseen un receptor antigénico con dos cadenas de polipéptidos similares a las de las moléculas de inmunoglobulinas, denominado receptor de linfocitos T. Estos receptores median la llamada *restricción por complejo mayor de histocompatibilidad* (CMH), ya que los linfocitos T sólo reconocen antígenos presentados por las células y unidos a este complejo. Además, presentan unos correceptores que intervienen en la unión con el CMH, y que los divide en dos subtipos principales: *los linfocitos CD8 o linfocitos T citotóxicos*, que reconocen antígenos presentados por el CMH1 que se encuentra en la superficie de todas la células, y *los linfocitos CD4 o linfocitos T colaboradores* que reconocen aquellos presentados por el CMH2, localizado exclusivamente en la superficie de células del sistema inmunitario, *las células presentadoras de antígenos* (CPA) (30).

Los *linfocitos T colaboradores o linfocitos T helpers (linfocitos Th)* se pueden diferenciar en tres poblaciones (Figs. 4 y 5). Los linfocitos Th1 se encuentran en el tejido conjuntivo y son activados por el CMH 2 presente en las CPA, en cuya respuesta producen sustancias como interferón  $\gamma$ , TNF  $\beta$  e IL-2, activando a los macrófagos por la vía clásica y modulando la inmunidad celular producida por éstos, los neutrófilos y otros linfocitos. Los linfocitos Th2

se encuentran principalmente en los tejidos linfoides, y su interacción con el CMH2 de las CPA, produce la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, cuya función es la de regular la inmunidad de tipo humoral llevada a cabo por los linfocitos B, reclutar y activar eosinófilos y activar los macrófagos por la vía alternativa. Finalmente, los linfocitos Th17, que secretan IL-17 y otras citoquinas, inducen la secreción de quimioquinas responsables del reclutamiento de los neutrófilos y monocitos hacia el lugar de la reacción (31).



**Figuras 4 y 5.** Diferenciación funcional de linfocitos colaboradores (Th) y producción de citoquinas asociadas.

### 3.4 Las células cebadas:

Son células móviles presentes en el tejido conjuntivo con un tamaño entre 8 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Presentan un núcleo redondo y centenares de gránulos metacromáticos específicos en su citoplasma, que poseen en su interior histamina, proteasas, glucuronidasa, hexosaminidasa, aril-sulfatasa y un factor quimiotáctico para eosinófilos (32). Se originan en la médula ósea en forma de precursores siendo liberadas a la sangre y pasando rápidamente a los tejidos en los cuales se produce su diferenciación. Su ciclo vital puede durar varias semanas o meses.

Se localizan dispersas por los tejidos del organismo, pero se encuentran en mayor abundancia en las zonas adyacentes a los vasos de pequeño calibre, en la proximidad a las zonas que sirven de interfase con el ambiente exterior (epitelio respiratorio e intestinal), en el sistema nervioso y en la membrana sinovial y el tejido óseo no mineralizado (32).

Las células cebadas o *mastocitos* son las células de primera línea encargadas de producir la respuesta inmune mediada por IgE, principalmente provocada por parásitos. Su activación da lugar a una rápida liberación del contenido de sus gránulos por un mecanismo llamado exocitosis compuesta, en el cual se unen todos los gránulos entre sí y éstos a su vez con la superficie de la célula, formando un canal limitado por la membrana que se introduce en profundidad en el citoplasma. La liberación de estos mediadores induce la formación y liberación de citoquinas que favorecen la migración de otras células con respuesta inflamatoria. Además, produce la liberación de inmunoglobulina E, que no es capaz de pasar al torrente sanguíneo, y se fija a los receptores de las células cebadas como forma de memoria antigénica, para producir una respuesta rápida en caso de nuevo contacto con el antígeno (29).

Además de esta respuesta humoral, las células cebadas tienen un importante papel en la respuesta inmune innata y adaptativa, presentando la capacidad de interactuar con los linfocitos T. Esta interacción puede producirse a través de la liberación selectiva de citoquinas (piecemeal) que contribuyen a la migración y activación de los linfocitos T o por medio del contacto directo a través de la presentación de antígenos por el CMH 1 (33).

Las células cebadas pueden intervenir en la regulación de la respuesta inmune por medio de dos vías distintas (33):

- Inmunidad innata: gracias a los receptores tipo Toll y el receptor dectina-1 en la superficie de las células cebadas, éstas pueden reconocer por sí mismas a los patógenos y producir la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Este mecanismo perpetúa la respuesta inflamatoria, produciendo a su vez la activación de neutrófilos y células cebadas.
- Inmunidad adaptativa: ésta incluye la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La *inmunidad humoral* es la más conocida, ya que es el mecanismo por el cual se producen las reacciones alérgicas mediadas por IgE y el shock anafiláctico, debido a la liberación al torrente sanguíneo de histamina, prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias. Además producen una activación de los linfocitos B mediante la liberación de IL-4, IL-6 e IL-13, y la interacción directa del receptor CD40 de los linfocitos B con el ligando CD40 presente en la superficie de las células cebadas. De este modo, los linfocitos B producen más IgE y se perpetúa la respuesta inflamatoria.

#### **4. PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA PATOLOGÍA INFLAMATORIA Y TUMORAL.**

El tamaño de las poblaciones celulares viene determinado por el equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis. En condiciones normales este proceso está regulado de forma que las células proliferan ante la necesidad de crecimiento o necesidades de reparación tisular como la inflamación. En condiciones patológicas, como la inflamación crónica o el desarrollo de tumores, la proliferación celular escapa a esta regulación y se retroalimenta, de forma que se prolonga en el tiempo. En todos estos casos, la proliferación de las células viene marcada por los factores de crecimiento, y las fases que contempla son la replicación del ADN y la mitosis. Los factores de crecimiento son proteínas que estimulan la supervivencia y proliferación de las células, así como su migración, diferenciación y otras respuestas celulares. Favorecen la proliferación celular mediante la unión a receptores específicos e inducen la expresión de genes que estimulan la entrada de las células en el ciclo celular, eliminan bloqueos en la progresión del mismo, evitan la apoptosis y fomentan la producción de proteínas que participan en la mitosis. Muchos de los factores de crecimiento implicados en la proliferación celular pueden ser liberados por células inflamatorias como los linfocitos T, los macrófagos o las células cebadas (31).

En el caso de la inflamación, las células inflamatorias intervienen en el proceso de reparación celular liberando factores de crecimiento como el EGF (factor de crecimiento epidérmico), VEGF, PDGF y factores de crecimiento fibroblástico, que inducen la proliferación de diferentes tipos de células: células propias del tejido lesionado encargadas de recuperar el tejido normal, células endoteliales vasculares para generar vasos que aporten nutrientes al tejido, y fibroblastos, que forman el tejido cicatricial que ocupa el espacio que no se puede regenerar. En la inflamación aguda este proceso se encuentra limitado por factores que inhiben la proliferación una vez reparado el defecto, pero en la inflamación crónica, debido a la persistencia de factores que impiden la correcta reparación, como la infección o los cuerpos extraños, este proceso se mantiene en el tiempo, en un equilibrio entre la proliferación y la apoptosis (31).

En los tumores, coinciden distintas circunstancias que permiten la proliferación ilimitada en el tiempo:



- Autosuficiencia en el crecimiento: las células tumorales en algunos casos son capaces de producir factores de crecimiento por sí mismas gracias a los oncogenes, y, en otros, de estimular la producción de factores de crecimiento por otras células, como las inflamatorias y las del estroma.
- Insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento: mediante la mutación de genes supresores tumorales como el gen RB o el TP53.
- Evasión de la muerte celular: consiguen evitar la apoptosis o muerte celular programada.
- Potencial ilimitado de replicación: aunque las células humanas tienen una limitada capacidad de replicación de aproximadamente 60-70 divisiones determinada por la llamada senescencia, las células tumorales son capaces de multiplicarse indefinidamente. Parece que el acortamiento de los telómeros que se produce de forma repetida en las divisiones celulares normales, en el caso de las células tumorales se repara mediante la activación de la telomerasa, evitando así la catástrofe mitótica y alcanzando la inmortalidad.

## **5. ANGIOGÉNESIS EN LA PATOLOGÍA INFLAMATORIA Y TUMORAL.**

La angiogénesis es un proceso natural mediante el cual se forman vasos a partir de otros preexistentes. Durante la embriogénesis, juega un importante papel en el desarrollo (34). En el adulto, este proceso puede ocurrir de forma fisiológica en distintas funciones del organismo, o participar en procesos patológicos, como la inflamación crónica o el desarrollo de tumores.

Se ha visto que la capacidad de los tumores de crecer sin angiogénesis no excede de 1-2 mm de diámetro. Esto es así debido a que esa es la distancia máxima a la cual los nutrientes y el oxígeno (productos necesarios para el mantenimiento de las funciones celulares), y los productos de deshecho tienen la capacidad de difundir desde o hacia los vasos sanguíneos (35).

El proceso angiogénico depende del equilibrio entre factores activadores e inhibidores (36), y es el entorno del proceso patológico, mediante los mediadores producidos por las células inflamatorias y tumorales, el que se encargará de mantener la angiogénesis. En condiciones normales, la influencia de los factores inhibidores es mayor que la de los activadores, pero, en determinados procesos como la inflamación crónica o los tumores, en los que resulta necesario una remodelación constante del tejido conjuntivo y la matriz extracelular, este equilibrio se encuentra inclinado hacia los factores activadores, lo que inicia un proceso de activación de las células endoteliales, y la correspondiente angiogénesis que se mantiene en el tiempo mientras persiste el estímulo de las células tumorales e inflamatorias.

Estos neovasos formados, aunque están compuestos por células endoteliales, células murales (musculares lisas o pericitos) y membrana basal, están alterados estructural y funcionalmente. Son irregulares en su tamaño, forma, y patrón de ramificación, y no muestran ninguna de las características propias de arteriolas, capilares y vénulas. Las células endoteliales asociadas a tumores proliferan de 50 a 200 veces más rápido que en condiciones normales, y forman un endotelio defectuoso que presenta huecos o soluciones de continuidad que favorecen el sangrado y la invasión de células tumorales (37).

En 1971 *Folkman* publicó un artículo que relacionaba la angiogénesis con el desarrollo tumoral, y postulaba la posibilidad de interferir en este proceso como tratamiento para frenar el crecimiento del mismo (38). Aunque numerosos estudios han demostrado que los factores antiangiogénicos pueden inhibir el crecimiento tumoral, los beneficios en la práctica clínica han sido limitados (39). Probablemente, la presencia de multitud de diferentes factores angiogénicos en el seno de estas patologías, sea la causa de que modificar únicamente la actividad de uno de ellos, no sea capaz de revertir completamente el proceso.

## **6. PAPEL DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS EN LA INFLAMACIÓN CRÓNICA.**

La inflamación aguda es una respuesta defensiva del huésped ante la agresión por agentes exógenos o endógenos. Este proceso consiste fundamentalmente en el reconocimiento del agente lesivo, el reclutamiento de los leucocitos, principalmente polimorfonucleares, la retirada del agente y la resolución del proceso mediante los mecanismos de reparación.

La inflamación crónica es aquella inflamación que se produce de forma sostenida durante semanas o años, en la cual es posible encontrar focos de inflamación, de lesión tisular y de cicatrización simultáneamente. Se caracteriza por presentar varios patrones consistentes en la infiltración por células mononucleares, la destrucción tisular producida por los productos liberados por las células inflamatorias, y los mecanismos de reparación tisular de angiogénesis y fibrosis. La inflamación puede volverse crónica cuando no es posible resolver el proceso agudo, bien porque no es posible eliminar el agente, bien por interferencia con el proceso de curación normal.

### **6.1 Los macrófagos y la inflamación crónica:**

En la inflamación crónica, para mantener estos patrones simultáneos de inflamación, lesión y reparación tisular, se producen complejas interacciones entre las distintas células características de este proceso. Las células más importantes que intervienen en el desarrollo de la inflamación crónica son los macrófagos y los linfocitos. Ambos tipos celulares colaboran en la activación y modulación de la actividad de la otra célula, produciéndose un efecto de retroalimentación que favorece la prolongación en el tiempo de la respuesta.

Los macrófagos tisulares son activados por dos mecanismos distintos en respuesta a la exposición a un agente extraño:

- Vía clásica: inducida por productos microbianos, señales generadas por los linfocitos T (principalmente el INF- $\gamma$ ) y por sustancias extrañas. Los macrófagos activados por esta vía producen enzimas lisosómicas, NO (óxido nítrico) y ERO (especies reactivas de oxígeno) que aumentan su capacidad fagocítica, y citoquinas que intervienen en la inflamación. Esta vía de activación es de especial importancia en la producción y mantenimiento de la inflamación crónica.
- Vía alternativa: su activación es producida por citoquinas como la IL-4 y la IL-13 producidas por los linfocitos T y otras células como los mastocitos y los eosinófilos. Los macrófagos activados por esta vía no son microbicidas, sino que participan principalmente en la reparación tisular secretando factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis, activan los fibroblastos y estimulan la formación de colágeno.

En la inflamación crónica, al contrario que en el proceso agudo, los macrófagos no se eliminan una vez desaparece el estímulo, sino que persisten en los tejidos, siendo reclutados de la sangre, y proliferando, manteniendo en el tiempo su actividad como células fagocíticas y como células presentadoras de antígenos a los linfocitos Th. La interacción de los linfocitos Th con los macrófagos juega un papel fundamental en el desarrollo de la inflamación crónica. Como ya hemos visto, los macrófagos expresan antígenos y correceptores y secretan citoquinas que estimulan los linfocitos Th. Así mismo, los linfocitos T producen citoquinas responsables del reclutamiento y proliferación de los macrófagos. La consecuencia de todo esto es un ciclo de reacciones celulares cuyo resultado es la prolongación en el tiempo del proceso de inflamación crónica (31).

## **6.2 Las células cebadas y la inflamación crónica:**

Los macrófagos y los linfocitos T son los principales actores del proceso de inflamación crónica, pero también intervienen otras células en mayor o menor medida, como las células cebadas. El papel de los mastocitos en la inflamación crónica ha sido estudiado en distintas enfermedades tales como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la sarcoidosis o la esclerosis múltiple, y se ha observado el desarrollo de una afectación crónica de articulaciones, tracto gastrointestinal, sistema nervioso y piel en pacientes afectados de mastocitosis sistémica (40,41). Estos hallazgos han motivado el estudio del verdadero papel de las células cebadas en la inflamación crónica.

Se ha detectado que las células cebadas pueden intervenir en la actividad inflamatoria, interactuando con los linfocitos por dos mecanismos distintos (33):

- El **primer mecanismo** activa la migración, proliferación y activación de linfocitos T por medio de la liberación de factores quimiotácticos como CCL2, CCL4, CCL5, CCL10 y CXCL10. Además, la producción de las citoquinas TGF $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , induce la diferenciación del fenotipo Th17 de los linfocitos T, que a su vez participan en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos.
- El **segundo mecanismo** implica el sistema de contacto célula-célula por medio del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad), de forma que las células cebadas actúan como células presentadoras de antígenos. Las moléculas

CMH1 de la superficie de las células cebadas presentan el antígeno al receptor de las células T citotóxicas. El CMH2, actúa como presentador de antígeno para los linfocitos Th2, siendo también necesaria una interacción entre los ligandos y los correceptores. El sistema ligando-receptor OX40 permite que los mastocitos adquieran una capacidad reguladora, estimulando a los linfocitos Th2 por medio de los receptores, e induciendo su polarización por medio de la liberación de citoquinas (42). A su vez, los linfocitos Th pueden modular la actividad de las células cebadas por medio de la expresión del receptor FcεRI. Resulta necesario resaltar que toda esta actividad de las células cebadas en el proceso inflamatorio, ocurre por medio de una secreción selectiva o diferencial de mediadores independiente del proceso de degranulación propio de las reacciones alérgicas. Esta secreción selectiva sin degranulación por medio de microvesículas ha sido estudiada y comprobada con productos como la serotonina (43), la IL-6 (44) o los eicosanoides (45).

## **7. PAPEL DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS EN LA PATOLOGÍA TUMORAL.**

Se sabe que las células tumorales son capaces de producir factores angiogénicos y moduladores de las células inflamatorias, lo que conlleva que los tumores estén rodeados por un infiltrado de diferentes tipos de estas células (46). Los linfocitos y macrófagos son las células que encontramos en mayor proporción, aunque también se observan en menor medida células cebadas y neutrófilos (47). La relevancia de la presencia de estas células en el tejido tumoral radica en el papel que realizan en cuanto a una posible actividad inmunológica antitumoral, o, por el contrario, una colaboración en el desarrollo y migración de las células tumorales. Parece claro que las células estromales colaboran con las células tumorales y endoteliales en el proceso de neovascularización, presentando un papel predominante las células inflamatorias mediante la secreción de diversos factores de crecimiento (48). La presencia de linfocitos ha sido asociada con un mejor pronóstico clínico en algunos tipos de tumores sólidos como el tumor de ovario (49), el colorrectal (50) o el melanoma (51), mientras

que los macrófagos y las células cebadas han sido relacionados con una mayor angiogénesis e invasión tumoral, y por lo tanto un peor pronóstico (52) (53).

*Hans Schreiber y colaboradores* describieron por primera vez en 1995 la posibilidad de que la presencia de células mieloides en el tejido tumoral alterase la capacidad antitumoral de la respuesta inmune (54). La relación de estas células con la progresión del tumor a una fase angiogénica e inmunosupresora, implica la posibilidad del crecimiento indefinido del tejido tumoral, así como la de la migración de las células malignas a través de los vasos a otros órganos, y por tanto una mayor agresividad de la evolución del tumor. Éste es el reflejo de la compleja relación que existe entre las células tumorales y el sistema mielopoyético durante la progresión tumoral, gracias a la cual las células tumorales pueden inducir la producción de células precursoras mieloides y su migración hacia el tejido tumoral, así como la diferenciación de éstas una vez en el seno del tumor en células de estirpe monocítica, granulocítica o células supresoras derivadas de la médula (MDSCs) (55). Resulta por ello necesario el completo conocimiento de la activación y funcionamiento de las células inmunocompetentes en un ambiente tumoral, ya que podría representar un importante objetivo en el tratamiento de estos tumores con el fin de evitar su actividad inmunosupresora.

### **7.1 Los macrófagos asociados a tumores (TAMs):**

Los macrófagos son selectivamente atraídos hacia el tejido tumoral por factores quimiotácticos producidos por las propias células tumorales, tales como la CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8 o CXCL12, así como por citoquinas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (47). Una vez en el seno del tumor, se acumulan selectivamente en las regiones necróticas y avasculares, que se caracterizan por una baja tensión de oxígeno. Estas condiciones de hipoxia inducen la activación del factor de transcripción inducible por la hipoxia (HIF1 $\alpha$ ), que a su vez produce la activación de varios genes protumorales y un cambio en el metabolismo de la glucosa que les permitirá sobrevivir en estas regiones necróticas y llevar a cabo su actividad protumoral.

La plasticidad funcional de los macrófagos, les permite subdiferenciarse en células con distintas capacidades (56). Este proceso de diferenciación funcional es la llamada polarización, pudiendo dar lugar a macrófagos tipo M1 (vía clásica de activación) o M2 (vía alternativa) (57). Los macrófagos M1 poseen la facultad de eliminar microorganismos así como células

tumorales, de secretar elevados niveles de citoquinas proinflamatorias y agentes tumoricidas y de producir la estimulación de los linfocitos Th1 (58). Los macrófagos M2 presentan una limitada capacidad tumoricida y de presentación de antígeno, pero están mejor adaptados para promover la angiogénesis, los mecanismos de reparación tisular y suprimir la inmunidad adaptativa Th1 (59). Característicamente, esta polarización da lugar a macrófagos M1 con un fenotipo rico en IL-12 y pobre en IL-10, mientras que los macrófagos M2 presentan un perfil pobre en IL-12 y rico en IL-10. La polarización o diferenciación macrofágica ocurre gracias a la activación de determinados factores de transcripción como STAT1 en el caso de los M1, o STAT6 y STAT3 en el de los M2. La activación de estos factores de transcripción es mediada por IFN- $\gamma$  en los M1, e IL-4 e IL-10 en los M2 (55).

Una vez en el seno del tejido tumoral los TAMs pueden diferenciarse en distintos grados de cada uno de estos perfiles, lo que les conferirá una actividad antitumoral o protumoral. Esta diferenciación depende de múltiples factores como el tipo de tumor, su estadio, la localización intra o peritumoral, la hipoxia y otras señales microambientales (60). Aunque inicialmente los tumores parecen estar infiltrados fundamentalmente por macrófagos M1 con capacidad antitumoral, se ha observado que, en tumores avanzados, tanto en ratones como en humanos, los macrófagos suelen expresar un fenotipo M2 (61). Las señales microambientales producidas por las células tumorales son las responsables de que se produzca esta polarización de los TAMs hacia M2, gracias a la liberación de sustancias como PGE2, TGF $\beta$ , IL-6 e IL-10. Como consecuencia de todo esto, los macrófagos adquieren una actividad protumoral, promoviendo la proliferación, migración y supervivencia de las células tumorales en un ambiente inicialmente hipóxico gracias a la angiogénesis, y su evasión del sistema inmune como consecuencia de la actividad inmunosupresora.

Los TAMs atraídos por las células tumorales y polarizados por las sustancias que producen éstas, liberan diversos factores con actividad protumoral (55) (Tabla 1):

- Angiogénesis: intervienen moléculas como VEGF, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ FGF, y CXCL8. Además, el VEGF parece favorecer también la linfoangiogénesis y por tanto la diseminación de las células y la subsecuente aparición de metástasis linfáticas.
- Crecimiento tumoral: Mediante la producción de diversos factores de crecimiento como PDGF, EGF, y VEGF.

- Invasión tumoral: por medio de la producción de sustancias que favorecen la digestión de la matriz extracelular, como MMP2, MMP9 o activadores de las MMPs como las quimioquinas.
- Inmunosupresión: mediante una deficiente función como célula presentadora de antígeno, y una inhibición de la proliferación de linfocitos T de forma secundaria a la liberación de múltiples citoquinas, de las cuales las más estudiadas han sido la IL-10 y el TGF- $\beta$ , así como una escasa producción de citoquinas inmunoestimuladoras (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-12). También produce una desviación de la respuesta inmune adaptativa hacia el tipo Th2 mediado por la producción de CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24.

## TAMs y CANCER

<b>Angiogénesis</b>	VEGF, TNF- $\alpha$ , $\beta$ FGF, CXCL8
<b>Crecimiento tumoral</b>	PDGF, EGF, VGF
<b>Invasión tumoral</b>	MMP2, MMP9, quimioquinas
<b>Inmunosupresión</b>	IL-10, TGF- $\beta$ , CCL17, CCL18, CCL22

**Tabla 1.** Actividad protumoral de los TAMs y citoquinas implicadas.

### 7.2 Las células cebadas en la patología tumoral:

El verdadero papel de las células cebadas o mastocitos (MCs) en el desarrollo de la patología tumoral aún es desconocido en muchos aspectos, y su posible implicación como agentes anti o protumorales, continua siendo objeto de estudio. Algunos de los mecanismos de migración, relación con otras células inmunes mediante secreción selectiva de citoquinas y otros factores, y relación con las células tumorales, aún deben ser determinados.



La presencia de los MCs en el seno de los tumores fue descrita por primera vez por *Paul Ehrlich* en su tesis doctoral en 1878 (62), representando una de las poblaciones de células inflamatorias mayoritarias en dicha patología. No obstante fue su discípulo, *Westphal*, quien describió que las MCs tendían a acumularse en la periferia de los nódulos tumorales más que en el núcleo (63).

Los MCs son atraídos desde los tejidos por el factor de las stem cells (SCF) producido por las células tumorales, que origina la activación de éstas por medio del receptor C-KIT. Una vez activadas se incrementa la producción de IL-7 e IL-9, que favorece el reclutamiento de más MCs (64). Además del SCF, otros mediadores que promueven la atracción de MCS han sido identificados, como el FGF-2, VEGF, PD-ECGF, adenosina o adrenomedulina (65,66).

En el caso del tumor colorrectal, los grupos de *Acikalin* y *Yodavuh*, examinaron muestras de carcinoma colorrectal de 60 y 119 pacientes respectivamente, tratando de evaluar y cuantificar la densidad de MCs y perfiles vasculares en las mismas detectadas mediante técnicas inmunohistoquímicas (67,68,52). *Ribatti y colaboradores*, estudiaron y cuantificaron la presencia de estas células en el cáncer de endometrio comparado con la hiperplasia endometrial (69). Estos grupos coinciden en observar que una mayor densidad de células cebadas en estas muestras se correlaciona de forma significativa con una mayor densidad de vasos, y ambos a su vez, con un peor pronóstico de los pacientes, concluyendo que las células cebadas podrían desempeñar un papel promotor de la angiogénesis y por tanto de la progresión tumoral.

Una vez estimulados los MCs producen metaloproteasas y otros factores que promueven la angiogénesis y la invasión celular (70). Los MCs almacenan en sus gránulos triptasa y quimasa. Dos tipos diferentes de MCs han sido descritos en relación al tipo de proteasas que producen. Los mastocitos MC<sub>T</sub> contienen únicamente triptasa, mientras que los mastocitos MC<sub>TC</sub> contienen triptasa y quimasa (71).

Algunos estudios han relacionado la liberación de triptasa por estas células con una mayor actividad de angiogénesis, mediante un mecanismo de inducción de proliferación de células endoteliales dosis dependiente (72). La triptasa es capaz de estimular la proliferación de las células endoteliales, la formación de estructuras vasculares, la degradación de la matriz extracelular y la producción de MMPs (metaloproteasas de la matriz) y de activador tisular del plasminógeno. Éstos últimos colaboran en la destrucción de la matriz extracelular con la consiguiente liberación de VEGF y FGF-2 (72).

También se ha observado que los MCs son capaces de modular la proliferación tumoral por medio de la liberación de histamina, que puede inducir el crecimiento tumoral a través de los receptores H1, y suprimir la respuesta inmune por medio de los H2 (73).

Los MCs producen otros múltiples factores proangiogénicos, como el FGF-2, VEGF, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NGF (factor de crecimiento neural), así como la MMP-9 que puede producir la liberación de sustancias de la matriz extracelular con actividad angiogénica (70).

Una particularidad de los MCs parece ser su distinto comportamiento según su localización. Es posible encontrar MCs intra o peritumorales, y distintos estudios les han atribuido diferentes papeles. Parece que los MCs peritumorales se encuentran en mayor cantidad que los intratumorales, así como que los intratumorales poseen menos gránulos, hecho sugestivo de una secreción más activa (74,75). Algunos estudios han relacionado una mayor cantidad de MCs intratumorales con un mejor pronóstico, y una mayor cantidad de MCs peritumorales con un peor pronóstico (76,5).

Los MCs, atraídos por las células tumorales, y activados por los mediadores producidos por éstas, liberan sustancias con actividad pro y antitumoral (77) (Tabla 2):

- Angiogénesis: liberan múltiples factores proangiogénicos como VEGF, FGF-2, IL-8, triptasa, quimasa, NGF, heparina, y TGF- $\beta$ .
- Crecimiento tumoral: inducen la proliferación de las células tumorales mediante la producción de sustancias como la histamina y la triptasa.
- Invasión tumoral: la producción de metaloproteasas de la matriz como la MMP-2 y la MMP-9, produce la degradación de la matriz extracelular favoreciendo la invasión por las células tumorales.
- Inmunosupresión: inducen la tolerancia inmune por los linfocitos T reguladores por medio de la producción de IL-10, histamina, y TNF- $\alpha$ .
- Inmunestimulación: pueden producir activación de células inflamatorias, inhibición del crecimiento tumoral y apoptosis por medio de la liberación de citoquinas como IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, MCP-3, MCP-4, INF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , LTB4, y quimasa.

## MCs y CANCER

<b>Angiogénesis</b>	VEGF, FGF-2, IL-8, triptasa, quimasa, TGF- $\beta$ , heparina, NGF.
<b>Crecimiento tumoral</b>	Histamina, triptasa.
<b>Invasión tumoral</b>	MMP2, MMP9.
<b>Inmunosupresión</b>	IL-10, histamina, TNF- $\alpha$
<b>Inmunoestimulación</b>	IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, INF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TGF- $\beta$

**Tabla 2.** Actividad anti y protumoral de los MCs y citoquinas implicadas.

## 8. HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA:

### 8.1 Fisiopatología.

La hiperplasia benigna de próstata es una patología masculina que se presenta a partir de los 40 años, y cuya frecuencia aumenta con la edad, llegando a una prevalencia del 80% en la novena década de la vida (16). Aunque la hiperplasia de próstata es una enfermedad de carácter benigno, representa el motivo más frecuente de consulta con el urólogo en pacientes de edad media y avanzada, debido a su importante repercusión sobre la calidad de vida de los pacientes y su elevada prevalencia en la población, siendo posible encontrar dicha patología en aproximadamente el 20-30% de los hombres a partir de la quinta década de la vida.

Esta patología se caracteriza por la proliferación de elementos estromales y epiteliales en forma de nódulos en la región transicional de la próstata, lo que produce un aumento del tamaño glandular. En el examen microscópico se objetiva que estas glándulas están formadas por dos capas celulares, una interna de células cilíndricas, y otra externa formada por células basales aplanadas (78). El desarrollo de estos nódulos parece producirse mediante la formación de nuevas estructuras glandulares y no mediante el crecimiento de las preexistentes, proceso extremadamente raro más allá del desarrollo embrionario (79).

A pesar de que aún no se ha establecido claramente la causa de esta patología, se sabe que esta proliferación necesita de un estímulo hormonal androgénico para producirse. La síntesis prostática de dehidrotestosterona (DHT) se produce a partir de la testosterona

circulante por medio de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2, y genera un derivado que es 10 veces más potente que la propia testosterona. Esta DHT se une a los receptores de andrógenos del núcleo de las células prostáticas y activa la transcripción de genes que favorecen la proliferación celular (78).

La hiperplasia benigna de próstata produce, debido a la compresión sobre la uretra secundaria al crecimiento prostático, síntomas miccionales de tipo obstructivo o de vaciado, tales como la dificultad para el inicio de la micción, el flujo miccional débil y entrecortado, así como el goteo postmiccional. Estos síntomas pueden ir acompañados de los denominados síntomas irritativos o de llenado, secundarios a la irritabilidad vesical, y que se caracterizan por polaquiuria, urgencia miccional y nicturia.

Existen numerosos estudios que relacionan la presencia de un patrón de inflamación crónica en el seno de esta patología con una más severa sintomatología del tracto urinario inferior (empeoramiento del International Prostate Symptom Score-IPSS) y un mayor tamaño prostático (80,81), concluyéndose que la inflamación crónica parece contribuir a la progresión de la hiperplasia benigna de próstata.

## **8.2 Las células inflamatorias en la hiperplasia benigna de próstata.**

La naturaleza del estímulo antigénico que inicia la respuesta celular inflamatoria en la próstata está aún por determinar, aunque se postula como posible origen la presencia de múltiples factores concomitantes. Como tales han sido propuestas diferentes situaciones como las infecciones bacterianas (*Escherichia coli*), virales (virus del papiloma humano, virus herpes simple, citomegalovirus), infecciones de transmisión sexual (*Neisseria gonorrhea*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*), factores dietéticos, hormonales, autoinmunes y de reflujo urinario intraluminal (82).

Los linfocitos T representan las células mayoritarias en el infiltrado inflamatorio de la glándula prostática, y constituyen la primera respuesta celular al daño que se establece en el tejido glandular prostático junto con la infiltración por macrófagos. Los macrófagos son atraídos por el estímulo antigénico, que procesan y presentan a los linfocitos T, mediando su atracción por medio de citoquinas como la IL-1 e IL-2 (83).

El papel que juegan las células inflamatorias en la patología prostática benigna ha sido ampliamente estudiado desde una perspectiva clásica. Se han identificado el tipo de células

que intervienen, principalmente macrófagos y linfocitos T, y la secuencia en la que aparecen, estableciéndose 3 patrones histopatológicos distintos que han sido denominados como prostatitis aguda, prostatitis crónica inactiva y prostatitis crónica activa. En estos patrones, ha sido posible identificar diversos tipos de células inflamatorias, tales como linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y polimorfonucleares, distinguiéndose según la proporción de éstos que presentan y su distribución (84):

En la *prostatitis aguda* es característica la presencia de focos de necrosis, y detritus celulares en la luz glandular. Las células inflamatorias principales son los neutrófilos y macrófagos, y es posible encontrarlos en el infiltrado linfoide periglandular y en la luz de las mismas.

En la *prostatitis crónica activa* los macrófagos se localizan principalmente en el estroma, aunque también se observan en el tejido inflamatorio periglandular y en la luz de las glándulas. Los linfocitos T se encuentran mayoritariamente en el estroma y alrededor de los cúmulos linfoides, así como en el epitelio basal de las glándulas dañadas.

Los linfocitos B aparecen de forma tardía, en los cúmulos linfoides adyacentes a las glándulas dañadas en la prostatitis crónica activa, y llegando a formar folículos linfoides en la *prostatitis crónica inactiva*.

En la hiperplasia benigna de próstata también es posible encontrar, aunque con mucha menor presencia, mastocitos. *Papadoukakis et al* (85), consiguieron demostrar con su modelo de rata con hiperplasia inducida por citral transdérmico, que con la aparición de esta patología, se produce un incremento en la concentración de mastocitos en el tejido ventral de la próstata. Así mismo, *Amir et al* (86), analizaron la presencia de mastocitos en diferentes patologías prostáticas en muestras de biopsia prostática, encontrando una mayor cantidad de estas células en el estroma fibromuscular comparado con las regiones de hiperplasia nodular, y aún menor en las zonas de inflamación aguda. *Aydin et al* (87) estudiaron la presencia y distribución de mastocitos en la hiperplasia benigna de próstata y el adenocarcinoma prostático, objetivando una concentración selectiva de éstos en el tejido fibromuscular en comparación con el área adenomatosa.

La liberación de citoquinas y otros factores de crecimiento en el estroma prostático por los mastocitos puede producir alteraciones de la homeostasis en este tejido, así como la de histamina ha demostrado poseer un significativo efecto sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos de la glándula prostática. Por otro lado, los mastocitos inducen la producción de estrógenos

activos que se unen a los receptores de estrógenos que se encuentran en el estroma y el epitelio de la próstata, contribuyendo al desarrollo de la hiperplasia benigna de próstata por medio de la inhibición de la apoptosis y la estimulación de la contracción del músculo liso prostático (85).

### **8.3 Proliferación celular y angiogénesis en la hiperplasia benigna de próstata.**

La inflamación crónica contribuye al daño tisular en la hiperplasia benigna de próstata por medio de la liberación de citoquinas y factores de crecimiento, estableciéndose un círculo vicioso. Concretamente, se ha observado que la IL-8, producida por las células epiteliales prostáticas, puede inducir la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), promoviendo la proliferación estromal y epitelial, y por tanto, el anormal crecimiento de las glándulas prostáticas. Dado el papel de la IL-8 de nexo de unión entre la inflamación crónica prostática y la hipertrofia benigna, se postula como posible marcador de actividad inflamatoria en ésta patología (82).

La hipoxia local también puede contribuir al desarrollo de la hiperplasia benigna de próstata por medio de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden promover la neovascularización y liberación de factores de crecimiento (factor de crecimiento endotelial, IL-8, FGF-7, TGF- $\beta$  y FGF-2) que interactúan con las células inflamatorias, y las células epiteliales y estromales de la próstata, favoreciendo el crecimiento prostático (82).

## **9. ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA:**

### **9.1 Fisiopatología.**

El adenocarcinoma prostático se presenta generalmente en varones a partir de los 50 años, y representa la forma más frecuente de neoplasia maligna en el varón, teniendo una incidencia en nuestro país de aproximadamente 70 pacientes por cada cien mil habitantes, y una media de edad de diagnóstico de 69 años (88). No obstante, en la actualidad, la mortalidad del cáncer de próstata es reducida, en torno al 10%, habiéndose observado un

descenso en la misma en los últimos años gracias al diagnóstico precoz por medio del PSA. Este diagnóstico precoz mediante cribado oportunista, ocasiona también el diagnóstico y sobretratamiento de las formas menos agresivas de cáncer de próstata, por lo que es motivo de controversia.

Ha sido posible identificar distintos factores implicados en la patogenia del cáncer de próstata (89):

- Andrógenos: son un factor necesario para el desarrollo del cáncer de próstata, ya que se ha visto que este tumor no se desarrolla en varones castrados antes de la pubertad. Así mismo, se sabe que el cáncer de próstata se ve estimulado por medio de los andrógenos al unirse a su receptor, que produce la transcripción en el núcleo de genes protumorales. El tratamiento con antiandrógenos produce la involución parcial y el retraso del desarrollo del tumor.
- Edad: la incidencia de cáncer de próstata en el varón se relaciona de forma directa con la edad, resultando muy infrecuente su presencia por debajo de los 40 años.
- Herencia: el riesgo de desarrollar el tumor en pacientes con familiares de primer grado con cáncer de próstata es el doble. Además, cerca de un 9% de los varones con cáncer de próstata presenta criterios de cáncer hereditario (90).
- Raza: el cáncer de próstata presenta su mayor incidencia en los varones de raza negra, y la menor en los de raza asiática.

Aunque no hay una clara relación molecular ni genética entre la hiperplasia benigna y el adenocarcinoma de próstata y diferentes mecanismos parecen estar implicados en la progresión de dichas enfermedades, los estudios epidemiológicos objetivan datos coincidentes como el aumento de la incidencia y prevalencia de ambas patologías con la edad, su hormonodependencia y su asociación con el proceso de inflamación crónica. Es por ello que se cree que pueden presentar como denominador común para su desarrollo y progresión la inflamación prostática crónica (91).

## **9.2 Las células inflamatorias en el adenocarcinoma de próstata.**

La inflamación puede jugar un papel en el proceso de carcinogénesis mediante el daño celular y genómico, promoviendo el recambio celular y creando un microambiente que favorece la replicación celular, la angiogénesis y la reparación tisular. La alta prevalencia de infiltrados de inflamación crónica en el estudio anatomopatológico de las piezas de prostatectomía radical, biopsia prostática y resección transuretral de próstata sugiere una posible relación entre la inflamación crónica y el adenocarcinoma de próstata (92).

La atrofia inflamatoria proliferativa (PIA) típicamente asociada con la inflamación prostática, es considerada un precursor de la neoplasia intraepitelial de alto grado (HGPIN) y el adenocarcinoma prostático. Las lesiones PIA suelen aparecer en la zona periférica como consecuencia de la proliferación regenerativa de las células epiteliales en respuesta al daño causado por la infección, el daño celular oxidativo, la hipoxia o la autoinmunidad. Así mismo, se ha determinado una vía genética de desarrollo entre PIA, HGPIN y cáncer, con mutaciones progresivas del gen TP53 así como ganancias de secuencias de DNA centromérico del cromosoma 8 y la hipermetilación de la glutatión S-transferasa P1 (GSTP1) (93,94).

En el infiltrado celular inflamatorio asociado al tumor de próstata ha sido posible identificar macrófagos similares a los encontrados en otros tumores (TAMs), que resultan atraídos por factores quimiotácticos liberados por las células tumorales prostáticas, como el M-CSF, el TGF- $\beta$ 1 o el VEGF. La distribución y valor pronóstico de los TAMs presentes en el adenocarcinoma prostático ha sido estudiado por diferentes grupos.

Así, *Halin et al* (95) observaron la distribución de los macrófagos y su relación con las células endoteliales en modelos murinos con tumor de próstata, encontrando que los macrófagos se distribuían en el tejido tumoral y extratumoral, siendo mayor su concentración en las regiones invasivas. Del mismo modo, encontraron que sólo había relación directa entre tamaño tumoral y angiogénesis, y los macrófagos extratumorales. El tratamiento de estos ratones con liposomas de clodronato (un bifosfonato que induce la apoptosis de los macrófagos) no sólo conseguía reducir la población de células macrofágicas, sino también el crecimiento tumoral y la angiogénesis.

*Fujii et al* (96) estudiaron el patrón de células inflamatorias (linfocitos T, linfocitos B, y macrófagos) en piezas de prostatectomía radical con focos de patología prostática benigna



(hipertrofia benigna de próstata) y maligna (PIN – neoplasia intraepitelial y adenocarcinoma). Encontraron que la cantidad de células inflamatorias en la patología benigna era mucho mayor que en la maligna, y que el grado de inflamación no era diferente en los distintos grados de Gleason. Los linfocitos T, linfocitos B y macrófagos fueron las células predominantes presentes en ambas patologías, mientras que las células plasmáticas, los neutrófilos y los eosinófilos eran escasos. La cantidad de linfocitos B infiltrando lesiones de PIN y adenocarcinoma resultó significativamente menor que en el tejido benigno. La infiltración por macrófagos CD68+ fue mayor en el tejido benigno que en el PIN y el adenocarcinoma, mientras que los macrófagos CD204+ (M2) fueron más abundantes en la patología maligna. Estos resultados sugerían una correlación entre la infiltración de macrófagos M2, a los que se ha atribuido una capacidad inmunosupresora, y el inicio del proceso de carcinogénesis prostática.

*Lissbrant et al* (97) estudiaron la presencia de macrófagos asociados a tumores (TAMs) en el adenocarcinoma prostático en piezas de resección transuretral, y su asociación con variables clínico patológicas y de supervivencia. Cuantificaron la presencia de macrófagos, así como su densidad y área de superficie, e investigaron su relación con marcadores pronósticos como el estadio tumoral, el grado de Gleason, la presencia de metástasis, de angiogénesis y de proliferación tumoral y la supervivencia. De este modo, observaron que en tumores de bajo grado, con abundante estroma tumoral, los TAMs se localizaban predominantemente en el estroma, mientras que en tumores de alto grado se localizaban preferentemente entre las células epiteliales. La cantidad máxima y densidad de volumen de TAMs así como su área celular incrementaba junto con el grado de Gleason, no ocurriendo lo mismo con el número medio de macrófagos por unidad de volumen tumoral. También se encontró correlación positiva entre la densidad de volumen y la proliferación celular, y entre el área celular y cantidad máxima de TAMs y la angiogénesis. El área celular y la densidad de volumen de TAMs resultó mayor en tumores con índice de proliferación Ki-67 > 3%. Ni la densidad de volumen, ni el área celular ni la cantidad máxima de TAMs demostraron asociación con el estadio tumoral o la presencia de metástasis. El análisis de regresión mostró que la presencia de metástasis y la densidad de volumen de TAMs eran valores pronósticos independientes. Analizando los resultados, concluían que el aumento de la densidad de volumen en los tumores de alto grado era posiblemente secundario al aumento del tamaño de los macrófagos, y no debido a un aumento de la cantidad de macrófagos por unidad de volumen.

También ha habido grupos que se han centrado en el estudio del papel de los mastocitos o células cebadas (MCs) en esta patología. *Aydin et al* (4) trataron de determinar la utilidad de la cuantificación de MCs en la evaluación de lesiones prostáticas benignas (hipertrofia benigna de próstata) y malignas (adenocarcinoma de próstata), y su posible relación con el grado de Gleason. Así mismo, en las lesiones malignas diferenciaron la cuantificación de MCs intratumorales y peritumorales. Observaron que el número de MCs en la zona intratumoral fue significativamente menor que en la región peritumoral, aunque concluyen que esto puede ser debido a que las MCs degranuladas son más difícilmente identificables con el microscopio óptico, lo que llevaría a un recuento menor en las zonas de mayor actividad tumoral, donde se produce mayor degranulación. También fue significativa la diferencia entre la hiperplasia benigna y la región intratumoral, no encontrándose diferencias entre la hiperplasia y la región peritumoral. Tampoco se encontraron diferencias entre los distintos grupos de grado de Gleason. Estimaron que sería posible diagnosticar cáncer de próstata con un valor menor de 2.3 en la media de la cantidad de MCs con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 70%.

*Johansson et al* (98) evaluaron el papel de las MCs como marcadores pronósticos independientes en una cohorte de pacientes no tratados de cáncer de próstata y con un largo seguimiento. Observaron propiedades tumorales contrapuestas entre las MCs peritumorales e intratumorales, encontrando que las MCs intratumorales regulaban negativamente la angiogénesis y el crecimiento tumoral mientras que las MCs peritumorales favorecían la expansión del tumor, y se encontraban en mayor cantidad en los tumores resistentes a castración.

*Fleischman et al* (76) estudiaron la densidad de MCs en muestras de 2300 pacientes sometidos a prostatectomía radical. Encontraron que una alta densidad de MCs intratumorales se asociaba con PSA preoperatorio, grado de Gleason y estadio tumoral menor que los tumores con baja densidad de MCs, lo que confería un mejor pronóstico a estos pacientes.

Teniendo en cuenta las observaciones de todos estos estudios, parece que la infiltración tumoral por macrófagos asociados a tumores (TAMs), principalmente M2, favorece la inmunosupresión y la progresión tumoral, mientras que la infiltración por mastocitos (MCs), sobre todo en la región intratumoral, parece tener un efecto protector mediante la regulación negativa de la proliferación y la angiogénesis, asociándose con factores de mejor pronóstico.

### **9.3 Proliferación celular y angiogénesis en el adenocarcinoma de próstata.**

Se ha estudiado la presencia de numerosas quimioquinas en el microambiente tumoral del adenocarcinoma de próstata y su relación con las células tumorales, el estroma y el infiltrado inflamatorio, así como su papel promotor de la proliferación, angiogénesis e invasión tumoral.

*Nguyen et al* (99) hicieron una revisión sobre el papel de la IL-6 en la progresión del tumor de próstata. La IL-6 es una potente citoquina inflamatoria que puede ser liberada tanto por las células estromales del tumor de próstata como por las células tumorales prostáticas, encontrándose niveles elevados de IL-6 en pacientes con cáncer de próstata diseminado no tratado o resistente a la castración con respecto a pacientes sanos o con enfermedad localizada, lo que sugiere que sólo las células tumorales resistentes a la castración son capaces de producir IL-6. A pesar de esto, es posible encontrar receptores de IL-6 tanto en las células tumorales dependientes de andrógenos como en las resistentes.

La IL-6 interviene en diferentes procesos tumorales prostáticos por las siguientes vías:

- Interviene en el proceso inflamatorio tumoral por medio de la unión al receptor JAK que activa la translocación del factor STAT3 favoreciendo la transcripción de genes y formación de citoquinas como HIF-1 $\alpha$ , MMP-2, MMP-9, BCL-X, BCL-2 y VEGF.
- Por medio de la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/AKT) favorece el proceso de proliferación e inhibe el de apoptosis.
- Produce una sobreexpresión del factor VEGF y, por tanto, la activación del proceso de angiogénesis.

*Zhang et al* (100) recogieron algunos estudios en los que se evalúa la presencia de la quimioquina CCL-2 y su papel en la génesis tumoral y el desarrollo de metástasis. La CCL-2, también llamada quimioquina atrayente de monocitos 1 (MCP-1), se une al receptor CCR-2, que es expresado por numerosas células tumorales, entre ellas las de próstata, y se expresa en mayor cantidad cuanto más agresivo es el fenotipo celular. CCL-2 también se expresa en los osteoblastos y en las células endoteliales de la médula ósea, favoreciendo la aparición de

metástasis en el esqueleto mediante el estímulo directo de las células tumorales prostáticas y el indirecto de los osteoclastos en las lesiones óseas.

Se ha demostrado que CCL-2 interviene en diferentes procesos tumorales en la próstata:

- Induce in vitro la proliferación de las células tumorales por medio de la activación de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/AKT).
- Favorece la migración celular y la formación de metástasis gracias a la activación de diferentes enzimas (p70-S6 kinasa y GTPasa Rac) y mediado por el receptor de la trombina.
- Puede activar directamente la angiogénesis mediante su unión al receptor CCR-2 de las células endoteliales, así como mediante la inducción de VEGF-A y HIF-1.
- Induce la atracción y reclutamiento de los TAMs, que como ya hemos visto producen quimioquinas que favorecen la angiogénesis, la proliferación y la invasión tumoral.
- También puede influir sobre la función de los linfocitos T gracias a la unión al receptor CCR-2, que induce su diferenciación en linfocitos Th2.

*Wang et al* (101) realizaron un estudio inmunohistoquímico de la expresión de COX-2 y su relación con la densidad de macrófagos, linfocitos T y microvasos en 43 muestras de cáncer de próstata. La COX es una enzima que produce prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Algunos estudios han mostrado que la COX-2 puede poseer un papel en la génesis de algunas neoplasias mediante la estimulación de la proliferación tumoral, la angiogénesis y la inmunosupresión, la inhibición de la diferenciación epitelial y la apoptosis y promoviendo la invasión tumoral y las metástasis. Encontraron que hubo una relación estadísticamente significativa entre la elevada expresión de COX-2 y el grado de Gleason, así como entre la expresión de COX-2 y la densidad de linfocitos T, la densidad de macrófagos, y la densidad de microvasos. Concluyen, que aunque en otros estudios no ha sido posible establecer una relación entre la expresión de COX-2 y el grado de Gleason o el pronóstico del cáncer de próstata, en sus observaciones se detecta una expresión aumentada de COX-2 en las células tumorales, mayor cuanto mayor es el grado de Gleason, y asociado a un aumento en la densidad de factores de peor pronóstico como son la infiltración por células inflamatorias

(linfocitos T y macrófagos) y una mayor densidad de microvasos acorde con una mayor angiogénesis.

La COX-2 puede estimular el desarrollo tumoral en la próstata por diferentes mecanismos (102,103,104,105):

- Mediante la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas gracias a la COX-2, se produce la liberación de radicales libres y sustancias mutagénicas.
- Las prostaglandinas que se producen gracias a esta enzima, en concreto la PGE2, ha demostrado tener un efecto directo sobre la transcripción de HIF-1 $\alpha$ , y por tanto, sobre la formación de neovasos, por lo que favorece la angiogénesis tumoral.
- Produce estimulación de la proliferación tumoral gracias a la activación de la vía de la IL-6.
- Favorece la inhibición de la apoptosis mediante la afectación de la actividad de p53.

## **10. EL MÉTODO ESTEREOLÓGICO: APORTACIONES AL ESTUDIO CUANTITATIVO.**

### **10.1 El método estereológico: principios básicos.**

La estereología es una metodología coherente que combina la geometría estocástica y la estadística para cuantificar las propiedades geométricas de estructuras espaciales, generalmente tridimensionales, utilizando información adecuadamente muestreada y basándose en principios generales de análisis sencillos.

El método estereológico trata de dar respuesta a determinados problemas que aparecen cuando se pretende cuantificar objetos tridimensionales en una sección bidimensional. Mientras que por técnicas morfométricas podemos medir el tamaño, la forma o la situación de determinados elementos celulares o tisulares, siempre en dos dimensiones, mediante técnicas estereológicas podemos obtener valores tridimensionales. Esto se realiza mediante el empleo de fórmulas basadas en la existencia de relaciones geométricas entre parámetros tridimensionales y cantidades observadas en dos dimensiones.

El número de partículas  $N$  en un objeto tridimensional bien definido no guarda una relación simple con el número de perfiles de partículas observado en secciones bidimensionales, ya que esto último depende no sólo de  $N$ , sino también del tamaño, la forma y la orientación de las partículas en las 3 dimensiones. El objetivo primero de este recuento ha de ser entonces garantizar que todas y cada una de las partículas presentes tengan la misma probabilidad de ser incluidas en él. Para ello se utiliza una sonda de medida, que es un sistema que permite aislar el objeto o la parte de él que va a ser estudiado. La medición estereológica consiste, típicamente, en contar el número de puntos de prueba que coinciden con la región estudiada (impactos o “hits”), o el número de entrecruzamientos entre los segmentos de prueba y los perfiles de las estructuras de interés en la región estudiada, siendo ambos eventos sin dimensión ( $L^0$ ). Para efectuar una estimación imparcial de cualquier parámetro resulta fundamental la elección de una sonda correcta, que no “pierda” los objetos de interés, garantizando que las dimensiones de la sonda y de la característica geométrica que ésta explora suman como mínimo 3 ( $L^3$ ).

El principio del *disector físico* (106) elaborado por *Sterio* en 1984 se convirtió en el primer método imparcial para la estimación de la cantidad de objetos en un determinado volumen de tejido ( $N_v$ ), sin suposiciones adicionales, modelos o factores de corrección. Para ello utiliza el disector, una sonda de medida tridimensional que consta de un marco disector de área conocida con dos secciones en serie a una distancia conocida (altura del disector).

En 1986, *Gundersen* (107) aplicó el principio del disector físico (dos secciones a una distancia conocida) a los planos ópticos separados por una distancia conocida a través de una sección gruesa, dando lugar al *disector óptico*. Para evitar sesgos resulta preciso garantizar dos condiciones, que todas las partículas tengan la misma probabilidad de ser muestreadas o contadas y que ninguna partícula puede ser contada más de una vez. Para determinar las células que reúnen los criterios de recuento, se utiliza la regla de *Sterio* (106). Esta regla consiste en contabilizar aquellos núcleos (ya que se asume que cada célula presenta un único núcleo), que aparecen en cada área del disector del plano focal de referencia pero que no están presentes en el plano focal de observación. Resulta necesario, por tanto, conocer el grosor exacto de los disectores cuantificados, lo cual se consigue por medio de un dispositivo acoplado al microscopio óptico llamado microcator, que está conectado con el desplazamiento  $Z$  de la platina. Por convenio, a estas partículas (núcleos/células) se les asigna el símbolo  $Q^-$ .

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

## 1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

- 1.1. Los mecanismos de proliferación celular así como los de regulación de la apoptosis en las células tumorales del adenocarcinoma prostático están alterados.
- 1.2. Los macrófagos asociados a tumores (TAMs), intervienen en los procesos de proliferación, angiogénesis y migración celular en las próstatas tumorales favoreciendo dicho proceso.
- 1.3. Los mastocitos intervienen sobre los procesos de proliferación, angiogénesis y migración celular, pudiendo tener efectos favorables sobre el desarrollo y pronóstico del adenocarcinoma de próstata.

## 2. OBJETIVOS.

- 2.1. Determinar las diferencias en cuanto a la densidad de longitud y longitud absoluta de **vasos sanguíneos** en cada una de las zonas de la próstata normal, así como en próstata hiperplásica y adenocarcinoma de próstata.
- 2.2. Determinar las diferencias en cuanto a la densidad numérica y número absoluto de **macrófagos** y su distribución entre las distintas zonas prostáticas de próstatas control, así como con el adenocarcinoma prostático y la hiperplasia de próstata.
- 2.3. Determinar las diferencias en cuanto a la densidad numérica y número absoluto de **mastocitos** y su distribución entre las distintas zonas prostáticas de próstatas control, así como en el adenocarcinoma prostático y la hiperplasia de próstata.
- 2.4. Determinar las diferencias en cuanto a fracción de volumen y volumen celular promedio de **macrófagos** en próstata control, adenocarcinoma e hiperplasia prostática.
- 2.5. Establecer las posibles diferencias en cuanto a la cuantificación y distribución de las células inflamatorias, y su posible relación con los fenómenos de angiogénesis y proliferación.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---


## **1. MATERIAL.**

Se procedió a la obtención de 10 próstatas normales de varones sin patología reproductora o endocrina, edad (media  $\pm$  SD):  $33 \pm 8.5$ , rango: 20-47 años; fallecidos por accidente de tráfico en el Hospital Universitario de La Princesa, y que donaron sus órganos para trasplante (grupo CTRL).


También se obtuvieron muestras de 15 pacientes, edad (media  $\pm$  SD):  $75 \pm 10$ , rango: 65-85 años; sometidos a adenomectomía prostática como tratamiento de la hiperplasia benigna (grupo HBP). Una vez confirmada histológicamente la patología, el servicio de anatomía patológica cedió las piezas para su estudio.

Así mismo se obtuvieron piezas de 15 pacientes, edad (media  $\pm$  SD):  $60 \pm 7$ , rango 45-73 años; diagnosticados de cáncer de próstata mediante biopsia prostática transrectal y sometidos a prostatectomía radical abierta o laparoscópica como tratamiento quirúrgico (grupo Ca), cedidos tras su análisis por el servicio de anatomía patológica del centro antes mencionado para el proyecto de investigación.

En todos los casos, se obtuvo previamente la aprobación por el comité de ética del hospital (fig. 6) y la pertinente autorización familiar para la extracción prostática para su uso en un proyecto de investigación (fig. 7).



Hospital Universitario  
de La Princesa



**COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA**

Madrid, 6 de junio de 2003

El Comité Etico de Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa ha evaluado el proyecto de investigación:

**TITULO:** Diferencias inmunohistoquímicas y estereológicas entre las distintas regiones de la próstata humana normal. Su posible papel en la génesis de la hiperplasia benigna de próstata y en el carcinoma prostático.

**Investigador responsable en este Centro:** Fernando Teba

Este Comité Etico de Investigación Clínica considera que el proyecto de investigación es **ética y metodológicamente aceptable**. Así mismo, considera que el investigador es competente para llevar a cabo este proyecto.


**COMITE ETICO DE INVESTIGACION**  
**CLINICA. HOSPITAL UNIV. DE LA PRINCESA**

**Fdo: Dra. M<sup>a</sup> Angeles Gálvez Múgica**  
**SECRETARIA DEL C.E.I.C.**

Figura 6. Autorización del Comité de Bioética.



**Hospital Universitario  
de La Princesa**



**Madrid**

**AUTORIZACIÓN PARA LA EXTRACCIÓN DE LA GLANDULA PROSTÁTICA**

El Servicio de Urología del Hospital Universitario de la Princesa, al que pertenece el equipo de urólogos que van a realizar la extracción de los riñones que ustedes han donado, esta realizando en colaboración con el Departamento de Morfología de la Universidad Autónoma de Madrid, un estudio titulado "Diferencias inmunohistoquímicas y estereológicas entre las distintas regiones de la próstata humana normal. Su posible papel en la génesis de la hiperplasia benigna de próstata y en el adenocarcinoma prostático".

Para la realización de este estudio es necesario disponer de tejido prostático normal (perteneciente a sujetos sin enfermedad prostática conocida). Estas glándulas prostáticas solo se pueden obtener de autopsias o de personas que donan sus órganos. Es por ello que solicitamos su autorización para extraer la próstata y poder utilizar este tejido para el estudio mencionado. El manejo de las muestras se hará de forma anónima por lo que no se conocerá la identidad del donante.

Debe saber que esto no retrasará la extracción del resto de los órganos ni producirá alteraciones externas en el cadáver.

D/D\*.....como.....del  
fallecido D/D\*....., autorizo al  
equipo de urólogos de este Hospital para extraer la glándula prostática para su uso con  
fines científicos.

Madrid, .....

Firmado: .....

C/ Diego de León, 62  
28006 MADRID  
Tel.: 91 520 22 00  
Fax: 91 401 35 82

Figura 7. Modelo de consentimiento informado.

### 1.1. Determinaciones volumétricas en próstatas control (ctrl):

- Determinación del volumen prostático en fresco (Vprost):

$$V_{\text{prost}} (\text{cm}^3) = \text{Peso (gr)} / \text{Densidad}$$

Siendo densidad = 1.05 gr/cm<sup>3</sup>.

- Determinación de los volúmenes regionales (Vreg), sabiendo que según McNeal (12): zona de transición 5% de Vprost, zona central 25% de Vprost y zona periférica 70% de Vprost.

### 1.2. Determinaciones volumétricas en hiperplasia prostática (hbp):

- Determinación del volumen del adenoma en fresco (Vhbp):

$$V_{\text{hbp}} (\text{cm}^3) = \text{Peso (gr)} / \text{Densidad}$$

Siendo densidad = 1.05 gr/cm<sup>3</sup>.

### 1.3. Determinaciones volumétricas en próstatas con cáncer (Ca):

Se fija la pieza en paraformaldehído al 10% tamponado en PBS pH=7.4 durante 24-48 horas, y posteriormente se prepara realizando secciones de 5 mm perpendiculares a la cara posterior de la próstata hasta incluir la próstata completa en macrobloques. El ápex y la base se tallan perpendicularmente a los cortes descritos anteriormente y se incluyen en los casetes habituales.

Mediante la observación de todas las muestras con microscopio digital con programa de análisis de imágenes (Leica DMD108), se delinea el área tumoral obteniendo dicha medida en cada preparación. Conociendo el área tumoral de cada sección, y asumiendo que el tumor ocupa todo el espesor de la sección, podemos calcular el volumen del mismo de acuerdo al principio de Cavalieri.

$$V_{\text{ca}} (\text{cm}^3) = \sum V_{\text{ca}(1-n)}$$

Donde:

$$Vca_{(1-n)} = Aca_{(1-n)} \times h$$

Siendo  $Aca_{(1-n)}$  el área calculada para cada una de las secciones y  $h$  el grosor de la sección (5mm).

## 2. METODOLOGÍA HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA.

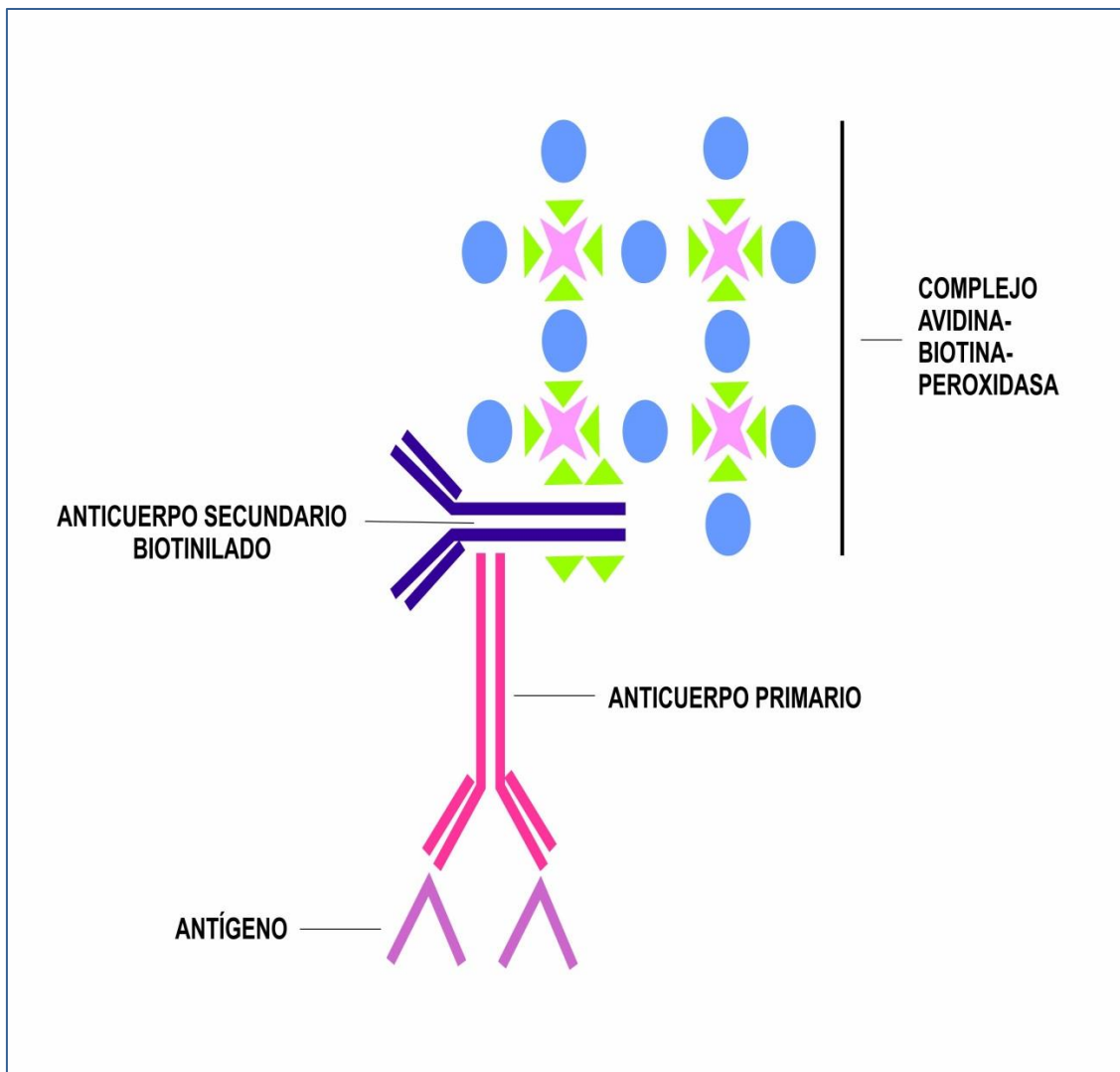
El material se fijó en paraformaldehído al 10% tamponado con PBS a pH 7.4 durante una semana. Transcurrida la primera hora de fijación, cada pieza se seccionó en rodajas de 3 mm de espesor medio, perpendiculares a la uretra, que se mantuvieron en el fijador hasta completar los siete días. Las rodajas se deshidrataron en serie creciente de alcoholes y se incluyeron en parafina.

De cada rodaja seleccionada por muestreo sistemático con comienzo al azar (108) se efectuaron cortes a un espesor nominal de 5  $\mu$ m con un micrótopo de parafina (Reichert-Jung 2030). Todos los cortes se recogieron sobre portaobjetos previamente tratados con Polylisina (Sigma Diagnósticos, St. Louis, USA). Por cada rodaja muestreada se obtuvieron 2 cortes, elegidos al azar, que se inmunotñeron para marcar los siguientes antígenos (tabla 3), con el fin de detectar las células en fase de proliferación celular (PCNA), los vasos sanguíneos (Factor VIII), los macrófagos (MAC387) y los mastocitos o células cebadas (C-KIT).

ANTICUERPO PRIMARIO	TIPO	DILUCIÓN	FUENTE
PCNA	monoclonal	1 : 400	Biomedica, Foster City, Ca, USA
Factor VIII	policlonal	1 : 1000	Sigma Diagnostics, St Louis, USA
MAC387	monoclonal	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA
C-KIT	monoclonal	1:400	Dako

**Tabla 3.** Relación de los anticuerpos primarios utilizados para la tinción inmunohistoquímica en el estudio.

En el presente trabajo se realizó una técnica inmunohistoquímica de tipo indirecto, utilizando anticuerpos marcados y el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (fig. 8). En un primer paso se añade el anticuerpo primario, el cual se une al antígeno presente en el tejido. Posteriormente se añade un anticuerpo secundario biotinilado que se liga al anticuerpo primario. A continuación, el trazador enzimático biotinilado se conjuga con el anticuerpo secundario. Dicho trazador está formado por moléculas de avidina, que consta de cuatro subunidades con regiones hidrofóbicas que se unen a la biotina en tres de estas cuatro regiones, quedando una libre para su unión con al anticuerpo secundario. El cromógeno sensible a la peroxidasa fue la diaminobenzidina.



**Figura 8.** Esquema del método de tinción inmunohistoquímica del complejo avidina-biotina-peroxidasa.

Para la tinción inmunohistoquímica los anticuerpos se diluyeron en una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS) más azida sódica al 0.1%.

Previo a la incubación, se realizó un pretratamiento de la muestra con el fin de facilitar la penetración de los anticuerpos y disminuir el marcaje inespecífico. La preincubación fue diferente en función del tipo de anticuerpo primario:

- *Anticuerpos PCNA, MAC-387 Y C-KIT*: consistió en calentar los tejidos a alta presión, inmersos en una solución de tampón citrato 0.01 M y pH 6.0, en olla a presión durante 10 minutos. Se dejaron enfriar, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario (109,110).
- *Anticuerpo Factor VIII*: se realizó tratamiento con proteasas mediante digestión con una solución de pepsina (Digest-All, Zymed, San Francisco, CA, USA) durante 10 minutos en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario (111).

La incubación con el antisuero primario se realizó durante 24 horas en cámara húmeda a una temperatura de 4°C.

La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación todas las secciones se trataron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Biomeda, Foster City, California) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se revelaron con una solución formada por 200 ml de PBS y 0.1 g de diaminobenzidina (3,3',4,4'-Tetraaminobifenilo; Sigma, St Louis, USA), a la que se añaden 40 µl de peróxido de hidrógeno al 30%, con lo que se obtiene un precipitado pardo de gran estabilidad en el lugar de unión del complejo.

A continuación, se procedió al contraste con Hematoxilina de Harris, consiguiendo teñir los núcleos de las células sin enmascarar el marcaje producido por los anticuerpos. Por último, las muestras se deshidrataron en serie creciente de alcoholes, se pasaron por xilol y se montaron con Depex (Serva, Heidelberg, Alemania).



### 3. METODOLOGÍA CUANTITATIVA: ESTIMACIONES

#### ESTEREOOLÓGICAS:

Sobre secciones muestreadas mediante muestreo sistemático con comienzo al azar, se delimitaron las regiones prostáticas de Mc Neal en las próstatas control (CTRL): zona periférica (ZP), zona transicional (ZT), y zona central (ZC); el adenoma en la HBP y las regiones con adenocarcinoma en las próstatas con tumor (Ca).

Sobre los campos muestreados en cada región prostática del grupo CTRL y en los grupos HBP y Ca se realizaron las siguientes estimaciones:

- Densidad de longitud ( $L_V$ ) y longitud absoluta ( $L$ ) de microvasos sanguíneos inmunoteñidos para Factor VIII.
- Densidad numérica y número absoluto de macrófagos estromales inmunoteñidos para MAC 387 ( $N_V$  mcstrom;  $N$  mcstrom).
- Densidad numérica y número absoluto de macrófagos intraepiteliales inmunoteñidos para MAC 387 ( $N_V$  mcep;  $N$  mcep).
- Densidad numérica y número absoluto de mastocitos totales inmunoteñidos para C-Kit ( $N_V$  ceb;  $N$  ceb).
- Densidad numérica y número absoluto de mastocitos periglandulares inmunoteñidos para C-Kit ( $N_V$  cebpg;  $N$  cebpg). Se consideran mastocitos periglandulares aquellos que se localizan o bien por dentro de la membrana basal del acino (en contacto con el epitelio) o una distancia máxima de 5  $\mu$ m por fuera de la membrana basal.
- Densidad numérica y número absoluto de células epiteliales ( $N_V$  ep;  $N$  ep).
- Índice de marcaje de PCNA (LI PCNA) del epitelio.
- Fracción de volumen del estroma ocupada por macrófagos inmunoteñidos para MAC 387 ( $V_V$  mcstrom).
- Fracción de volumen del epitelio ocupada por macrófagos inmunoteñidos para MAC 387 ( $V_V$  mcep).
- Volumen promedio del citoplasma de macrófagos estromales inmunoteñidos para MAC 387 ( $U_N$  mcstrom).
- Volumen promedio del citoplasma de macrófagos intraepiteliales inmunoteñidos para MAC 387 ( $U_N$  mcep).

En la Tabla 4, se resumen las variables estereológicas utilizadas en el presente estudio.

NOMBRE DE LA VARIABLE	SÍMBOLO	UNIDADES
Densidad de longitud de microvasos	$L_V$	$\text{mm}^{-2}$
Longitud absoluta de microvasos	$L$	Km
Densidad numérica de macrófagos estromales	$N_V \text{ mcstrom}$	nº de macrófagos $\times 10^3 / \text{mm}^3$
Número absoluto de macrófagos estromales	$N \text{ mcstrom}$	nº de macrófagos $\times 10^6$
Densidad numérica de macrófagos intraepiteliales	$N_V \text{ mcep}$	nº de macrófagos $\times 10^3 / \text{mm}^3$
Número absoluto de macrófagos intraepiteliales	$N \text{ mcep}$	nº de macrófagos $\times 10^6$
Densidad numérica de mastocitos totales	$N_V \text{ ceb}$	nº de mastocitos $\times 10^3 / \text{mm}^3$
Número absoluto de mastocitos totales	$N \text{ ceb}$	nº de mastocitos $\times 10^6$
Densidad numérica de mastocitos periglandulares	$N_V \text{ cebpg}$	nº de mastocitos $\times 10^3 / \text{mm}^3$
Número absoluto de mastocitos periglandulares	$N \text{ cebpg}$	nº de mastocitos $\times 10^6$
Densidad numérica de células epiteliales totales	$N_V \text{ ep}$	nº de c. epiteliales $\times 10^6 / \text{mm}^3$
Densidad numérica de células epiteliales PCNA+	$N_V \text{ ep+}$	nº de c. epiteliales $\times 10^6 / \text{mm}^3$
Índice de marcaje de PCNA en células epiteliales	$LI \text{ PCNA}$	--
Número absoluto de células epiteliales	$N \text{ ep}$	nº de c. epiteliales $\times 10^9$
Fracción de volumen de macrófagos estromales	$V_V \text{ mcstrom}$	--
Fracción de volumen de macrófagos epiteliales	$V_V \text{ mcep}$	--
Volumen promedio de macrófagos estromales	$U_N \text{ mcstrom}$	$\mu\text{m}^3$
Volumen promedio de macrófagos epiteliales	$U_N \text{ mcep}$	$\mu\text{m}^3$

**Tabla 4.** Listado de las variables absolutas y relativas empleadas. Se indica el símbolo y las unidades en las que se expresan.

Todas las medidas se realizaron con un microscopio Olympus provisto de un objetivo de inmersión 100x (apertura numérica 1.4). Los aumentos totales usados fueron 1200x. El microscopio está conectado a una videocámara y equipado con una platina motorizada acoplada a un ordenador DELL Optiplex GX110. El programa empleado (Stereologic Software Package Cast Grid, Interactivision Silkeborg, Dinamarca), regula el desplazamiento en X e Y de la platina y permite seleccionar los campos de medida en cada corte por muestreo sistemático con comienzo al azar después de la introducción, vía teclado, de una apropiada fracción de muestreo. El programa genera los retículos empleados (disector, retículos de puntos, etc.) que se superponen a la imagen microscópica capturada por la cámara y proyectada en el monitor.

### **3.1. Determinación estereológica de la densidad de longitud de vasos sanguíneos en próstatas patológicas y controles.**

Las microestructuras biológicas como capilares, túbulos y axones, pueden considerarse a efectos prácticos, como elementos lineales. El atributo estereológico más importante de estas estructuras lineales es la densidad de longitud ( $L_v$ ), es decir, la longitud de microvaso por unidad de volumen del espacio de referencia (111). Se empleó el retículo del disector para muestrear los perfiles vasculares inmunoteñidos para Factor VIII y elegibles para ser contados. La densidad de longitud se calculó aplicando la fórmula:

$$L_v = (2 \times \Sigma Q^-) / \Sigma A$$

Donde  $Q^-$  = número de perfiles vasculares inmunopositivos elegibles para conteo siguiendo la convención de Sterio (106) y  $\Sigma A$  = área total muestreada, es decir: área del retículo del disector ( $71303 \mu m^2$ ) multiplicada por el número de retículos seleccionados. La  $L_v$  se expresó en  $mm^{-2}$  (mm de longitud de vaso /  $mm^3$  de volumen de referencia).

### **3.2. Determinación estereológica de la densidad numérica de macrófagos y mastocitos en próstatas patológicas y controles.**

Para la estimación del número de células por unidad de volumen de espacio de referencia (densidad celular,  $N_v$ ) y el número de células por órgano (número absoluto,  $N$ ) se utilizó el método del disector óptico (107).

Para determinar las células que reúnen los criterios de recuento, se utiliza la regla de Sterio (106). Esta regla consiste en contabilizar aquellos núcleos (ya que se asume que cada célula presenta un único núcleo), que aparecen en cada área del disector del plano focal de referencia pero que no están presentes en el plano focal de observación. Por convenio, a estas partículas (células) se les asigna el símbolo  $Q^-$ . La altura del disector se obtiene mediante un microcator (Heidenhain, Traunsreut, Germany) que está conectado con el desplazamiento Z de la platina. El volumen del disector es igual al área del retículo de recuento, multiplicada por la distancia entre los planos (altura del disector):

$$V_{DIS} = S_D \times H_D$$

En donde:

$V_{DIS}$  = Volumen del disector.

$S_D$  = Área del retículo de recuento o área del disector ( $2852 \mu m^2$ ).

$H_D$  = Altura del disector ( $5 \mu m$ ).

Por tanto, la densidad numérica ( $N_V$ ) de partículas en el volumen de referencia será:

$$N_V = \Sigma Q^- / V_{DIS}$$

En donde:

$N_V$  = densidad numérica de células en el volumen de referencia.

$Q^-$  = Número de células que reúnen los criterios de recuento.

$V_{DIS}$  = Volumen del disector ( $14260 \mu m^3$ ).

Los resultados que se obtienen al realizar estos cálculos, vienen expresados un número de células /  $\mu m^3$ . Por comodidad a la hora de trabajar con ellos, se mostrarán en número de células /  $mm^3$ .

### **3.3. Determinación estereológica del índice de marcaje de PCNA en próstatas patológicas y controles.**

El índice de marcaje de PCNA se obtuvo como la razón:

$$LI_{PCNA} = N_{Vep+} / N_{Vep}$$

Donde  $N_v \text{ ep+}$  es la densidad numérica de células epiteliales con núcleos inmunorreactivos para PCNA y  $N_v \text{ ep}$  es la densidad numérica de células epiteliales inmunorreactivas y no inmunorreactivas para PCNA.

### **3.4. Determinación estereológica de la fracción de volumen y volumen celular promedio de macrófagos en próstatas patológicas y controles.**

Para estimar las fracciones de áreas se emplearon retículos de puntos, utilizando el software ya indicado: sobre un corte de tejido muestreado al azar, el retículo evalúa el número de puntos que caen sobre todo el corte (área de referencia) y sobre el compartimento a estudiar (por ejemplo, el epitelio). Según el principio de Delesse (112), la razón entre los puntos es equivalente a la razón entre las áreas y a la razón entre los volúmenes.

La fracción de volumen ocupada por el estroma y por el epitelio, en las regiones prostáticas control, carcinoma y HBP se evaluó por la siguiente fórmula:

$$V_v(\text{estromal o epitelial}) = \Sigma \text{puntos sobre estroma o epitelio} / \Sigma \text{puntos sobre tejido prost total}$$

La fracción de volumen ocupada por el citoplasma de los macrófagos inmunoteñidos para MAC 387 se obtuvo según la siguiente fórmula:

$$V_v \text{mc} = \Sigma \text{puntos sobre macrófagos inmunoteñidos} / \Sigma \text{puntos sobre espacio ref (estroma o epitelio)}$$

El volumen promedio de los macrófagos se obtuvo aplicando la fórmula siguiente:

$$U_N = V_v \text{mc} / N_v \text{mc}$$

Donde  $V_v \text{ mc}$  es la fracción de volumen ocupada por los macrófagos ya sea en el estroma o en el epitelio y  $N_v \text{ mc}$  es la respectiva densidad numérica de macrófagos.  $U_N$  se expresó en  $\mu\text{m}^3$ .

### **3.5. Determinación estereológica de parámetros absolutos de longitud de vasos sanguíneos y número de macrófagos, mastocitos y células epiteliales en próstatas patológicas y controles.**

Los parámetros absolutos (L, N mcstrom, N mcep, N ceb, N cebpg, N ep) se obtuvieron multiplicando los correspondientes parámetros relativos (densidades) por el volumen del espacio de referencia, calculado a su vez multiplicando la fracción de volumen estromal o epitelial por el volumen del espécimen: próstata normal (Vprost, Vreg), carcinoma (Vca) o adenoma prostático (Vhbp).

## **4. ESTADÍSTICA.**

Para todas las variables estudiadas, en todos los grupos, se obtuvieron los valores medios  $\pm$  SEM y se realizaron distintos análisis estadísticos.

### **4.1. Tablas de contingencia:**

- Con objeto de analizar la significación de la asociación de las diversas variables (relativas y absolutas) con los grupos de estudio (CTRL, HBP, Ca) mediante la prueba de  $\chi^2$ . Para ello, cada variable cuantitativa se agrupó mediante intervalos. Para la elección de los puntos de corte se utilizó el método de los percentiles, de manera que en cada variable se señaló un punto de corte marcado por el percentil 50, obteniéndose en cada una dos grupos de valores: inferior ( $\leq$  percentil 50) y superior ( $>$  percentil 50).
- Para analizar la asociación de las diversas variables (relativas y absolutas) en el grupo de adenocarcinoma, con la gradación de Gleason mediante la prueba de  $\chi^2$ . Para ello, cada variable cuantitativa se agrupó mediante intervalos. Para la elección de los puntos de corte se utilizó el método de los percentiles, de manera que en cada variable se señaló un punto de corte marcado por el percentil 50, obteniéndose en cada una dos grupos de valores: inferior ( $\leq$  percentil 50) y superior ( $>$  percentil 50). El grado Gleason se clasificó en dos grupos: A (Gleason  $\leq 7$ ) y B (Gleason  $>7$ ).

#### **4.2. Análisis de la varianza:**

- ANOVA de un factor para comparar los valores medios de las variables estudiadas entre las regiones prostáticas de los casos control: zona de transición (ZT), zona periférica (ZP), zona central (ZC). Tras el ANOVA se utilizó el test de Student-Newman-Keuls para la comparación múltiple de medias.
- ANOVA de un factor para comparar los valores medios de las variables estudiadas entre los controles (CTRL), hiperplasia prostática (HBP) y adenocarcinoma (Ca). Tras el ANOVA Se utilizó el test de Student-Newman-Keuls para la comparación múltiple de medias.
- ANOVA de un factor para comparar los valores medios de  $V_v$  mc y de  $U_N$  mc entre el compartimento epitelial y el estromal en CTRL, HBP y Ca, respectivamente. Se utilizó el Test de la t de Student para la comparación de medias.

#### **4.3. Correlación de Pearson:**

- Con objeto de analizar las interrelaciones entre los diversos parámetros en cada grupo de estudio (CTRL, HBP y Ca) se efectuó un estudio de correlación de Pearson, para, a continuación, en el caso de los pares de variables con correlación significativa, someterlas a un análisis de regresión lineal. Solo se efectuó este estudio para las variables relativas, pues en el caso de las absolutas, el factor que puede introducir cambios en las correlaciones es el volumen de cada compartimento, ya que dichas variables se obtienen multiplicando la correspondiente variable relativa por el volumen del espacio de referencia.

#### **4.4. Análisis de conglomerados:**

Con el análisis de conglomerados se propusieron los siguientes objetivos (113):

- Estudiar que variables son capaces de agrupar los resultados de modo que la “distancia” entre cada caso de un grupo al centro del grupo o conglomerado sea menor que las “distancias” de esos casos a otros casos agrupados en conglomerados distintos.

- Comprobar si los conglomerados definidos por el análisis son superponibles y en qué grado, a los grupos de estudio (CTRL, HBP, Ca).

Para evitar interacciones artefactuales entre variables, se incluyeron en el análisis exclusivamente las variables no correlacionadas entre sí. Tras el análisis de correlación de Pearson, se definen 2 conjuntos de tríadas de variables no correlacionadas (uno de variables relativas y el otro de variables absolutas) (ver Tablas 5, 6). Las tríadas de variables incorreladas se aplicaron sucesivamente a la agrupación de los casos, en dos situaciones distintas:

- En 3 conglomerados (C1, C2, C3), para asociar cada conglomerado con un grupo de estudio (CTRL, HBP, Ca).
- En 2 conglomerados (C1, C2), para asociar cada conglomerado con los casos reales agrupados como especímenes benignos: B (CTRL + HBP) o como casos malignos: M (Ca).

En las dos situaciones, se estudió la asociación de cada conglomerado con cada grupo de estudio mediante el uso de tablas de contingencia y el contraste de  $\chi^2$ .

VARIABLE 1	VARIABLE 2	VARIABLE 3
L <sub>v</sub>	LI PCNA	N <sub>v</sub> cebpg
L <sub>v</sub>	LI PCNA	N <sub>v</sub> ep
L <sub>v</sub>	N <sub>v</sub> ceb	N <sub>v</sub> ep
L <sub>v</sub>	N <sub>v</sub> cebpg	N <sub>v</sub> ep
LI PCNA	N <sub>v</sub> mcstrom	N <sub>v</sub> ep
LI PCNA	N <sub>v</sub> mcep	N <sub>v</sub> cebpg
LI PCNA	N <sub>v</sub> mcep	N <sub>v</sub> ep
LI PCNA	N <sub>v</sub> ceb	N <sub>v</sub> ep
LI PCNA	N <sub>v</sub> cebpg	N <sub>v</sub> ep
N <sub>v</sub> mcstrom	N <sub>v</sub> ceb	N <sub>v</sub> ep
N <sub>v</sub> mcstrom	N <sub>v</sub> cebpg	N <sub>v</sub> ep
N <sub>v</sub> mcep	N <sub>v</sub> ceb	N <sub>v</sub> ep
N <sub>v</sub> mcep	N <sub>v</sub> cebpg	N <sub>v</sub> ep

**Tabla 5.** Tríadas de variables relativas no correlacionadas, empleadas en el análisis de conglomerados.



VARIABLE 1	VARIABLE 2	VARIABLE 3
N mcep	N ceb	LI PCNA
N mcep	N cebpg	LI PCNA

**Tabla 6.** Triadas de variables absolutas no correlacionadas, empleadas en el análisis de conglomerados.

Se estableció el nivel de significación para  $p < 0.05$ , en todos los análisis empleados. Para la realización de la estadística se ha empleado el software SPSS 19.0 (IBM, New York, USA). Para la elaboración de las gráficas se ha empleado el programa Graph-Pad 6.03 (Graph Pad Software, San Diego, USA).

## 5. FOTOGRAFÍA.

Las fotografías de las secciones histológicas se tomaron con una cámara digital acoplada a un microscopio Olympus, mediante el programa de captura de imágenes DP Controller 2.1.1.183.

## RESULTADOS

---

## **1. HISTOLOGÍA CONVENCIONAL.**

### **1.1. Próstata control:**

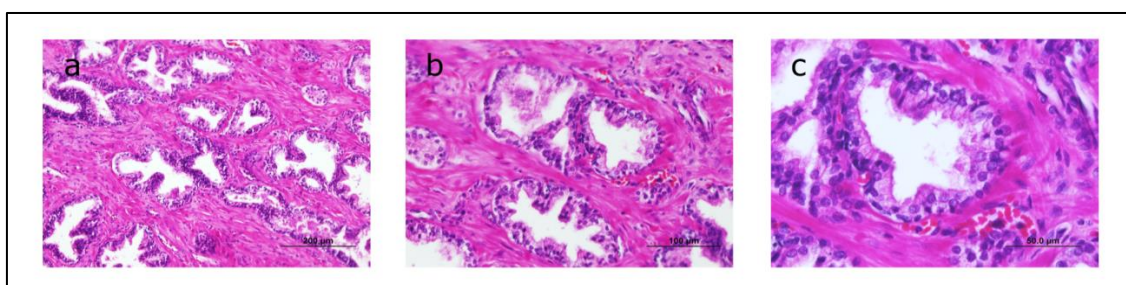
Con la tinción de hematoxilina-eosina se observa que el tejido prostático normal presenta glándulas de distintos tamaños inmersas en un estroma fibromuscular. Estas glándulas tienen una morfología más regular y tubular en la región transicional (fig. 9), mientras que en las regiones periférica y central son tubuloacinares y con prolongaciones digitiformes de aspecto papilar en su luz (fig. 10).

Además se observa una región en la parte anterior de la próstata, en la que no se encuentran glándulas, y que está compuesta fundamentalmente por fibras musculares lisas en la base y fibras musculares estriadas más cerca del ápex prostático.

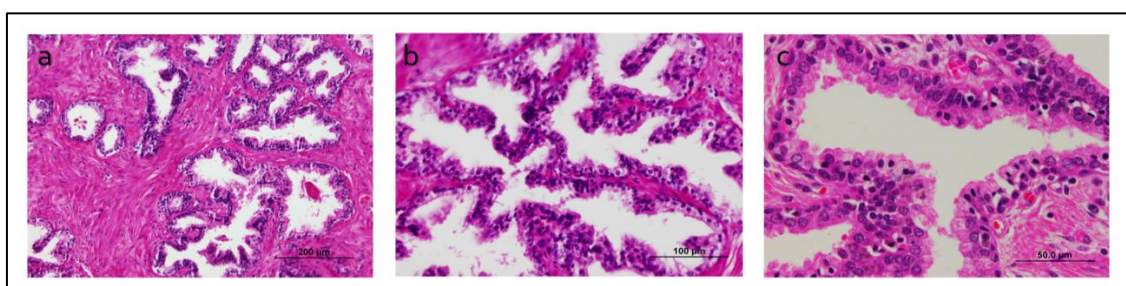
Las glándulas están recubiertas por células epiteliales y basales. En la región transicional las células epiteliales presentan una forma cuboidal, y las células basales se disponen de manera pseudotransicional debido a su cercanía con la uretra (fig. 9c). En las regiones periférica y central las células epiteliales tienen una morfología cilíndrica que se disponen en un solo estrato, y las células basales se encuentran formando una capa continua sobre la membrana basal (figs. 10c y 11c).



**Figura 9.** Tinción hematoxilina-eosina de región transicional en próstata control a distinta magnificación (ver escala en cada figura), mostrando estructuras tubuloacinares y su desembocadura en la uretra, con epitelio glandular cuboidal y células basales, que por su cercanía a la uretra se disponen de manera pseudotransicional.



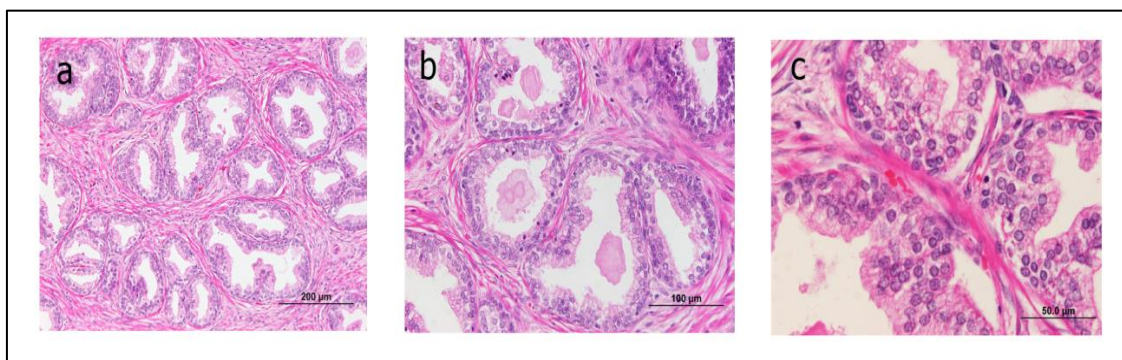
**Figura 10.** Tinción hematoxilina-eosina de región periférica en próstata control a distinta magnificación (ver escala en cada figura). Se observan estructuras glandulares alveolares con epitelio de células cilíndricas que se disponen en un solo estrato, y formando estructuras papilares hacia el interior de la glándula.



**Figura 11.** Tinción hematoxilina-eosina de región central en próstata control a distinta magnificación (ver escala en cada figura). Se observan estructuras glandulares tubuloacinares con epitelio de células cilíndricas que se disponen en un solo estrato, y formando estructuras papilares hacia el interior de la glándula.

## 1.2. Hiperplasia prostática:

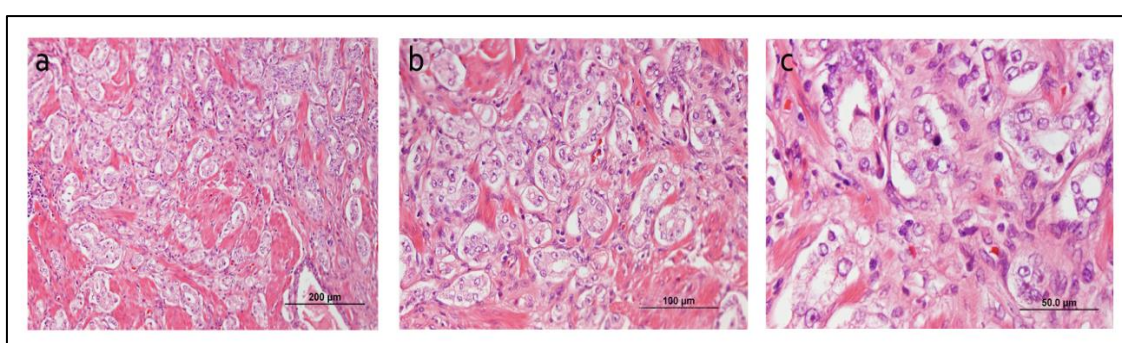
La tinción con hematoxilina-eosina de las próstatas del grupo hiperplasia permite observar un aumento de la cantidad y el volumen glandular, tanto de los acinos como de los conductos, así como de la porción estromal (fig. 12). Estas glándulas aparecen en muchos casos con una dilatación de aspecto quístico así como material amiláceo en su interior (fig. 12b). El epitelio es cilíndrico con una capa de células basales (fig. 12c).



**Figura 12.** Tinción hematoxilina-eosina de hipertrofia benigna de próstata a distinta magnificación (ver escala en cada figura). Se observa aumento de la cantidad y el tamaño de las glándulas, con menor cantidad de tejido conjuntivo entre ellas y con estructuras papilares hacia la luz de las mismas, así como presencia de secreciones y cuerpos amiláceos en su interior.

### 1.3. Adenocarcinoma prostático.

En el grupo de adenocarcinoma prostático, con la tinción de hematoxilina eosina es posible identificar el crecimiento desordenado de las glándulas prostáticas, con escaso estroma entre ellas, y de márgenes más o menos imprecisos dependiendo de la gradación del mismo, teniendo en cuenta que todas las muestras presentaban un Gleason 6-7 (fig. 13). También se aprecia irregularidad en el tamaño y morfología glandular, existiendo glándulas pequeñas o grupos celulares aislados que invaden el estroma (fig. 13b,c). En algunos casos era posible apreciar glándulas fusionadas, patrones cribiformes o células claras (fig. 13c).



**Figura 13.** Tinción hematoxilina-eosina de carcinoma de próstata a distinta magnificación (ver escala en cada figura). Se observa aumento de cantidad de las glándulas que son de menor tamaño y con arquitectura distorsionada con fusión de algunas de ellas, así como disminución de la cantidad de tejido conjuntivo entre las mismas.

## **2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.**

### **2.1. Inmunotinción proliferación celular (PCNA):**

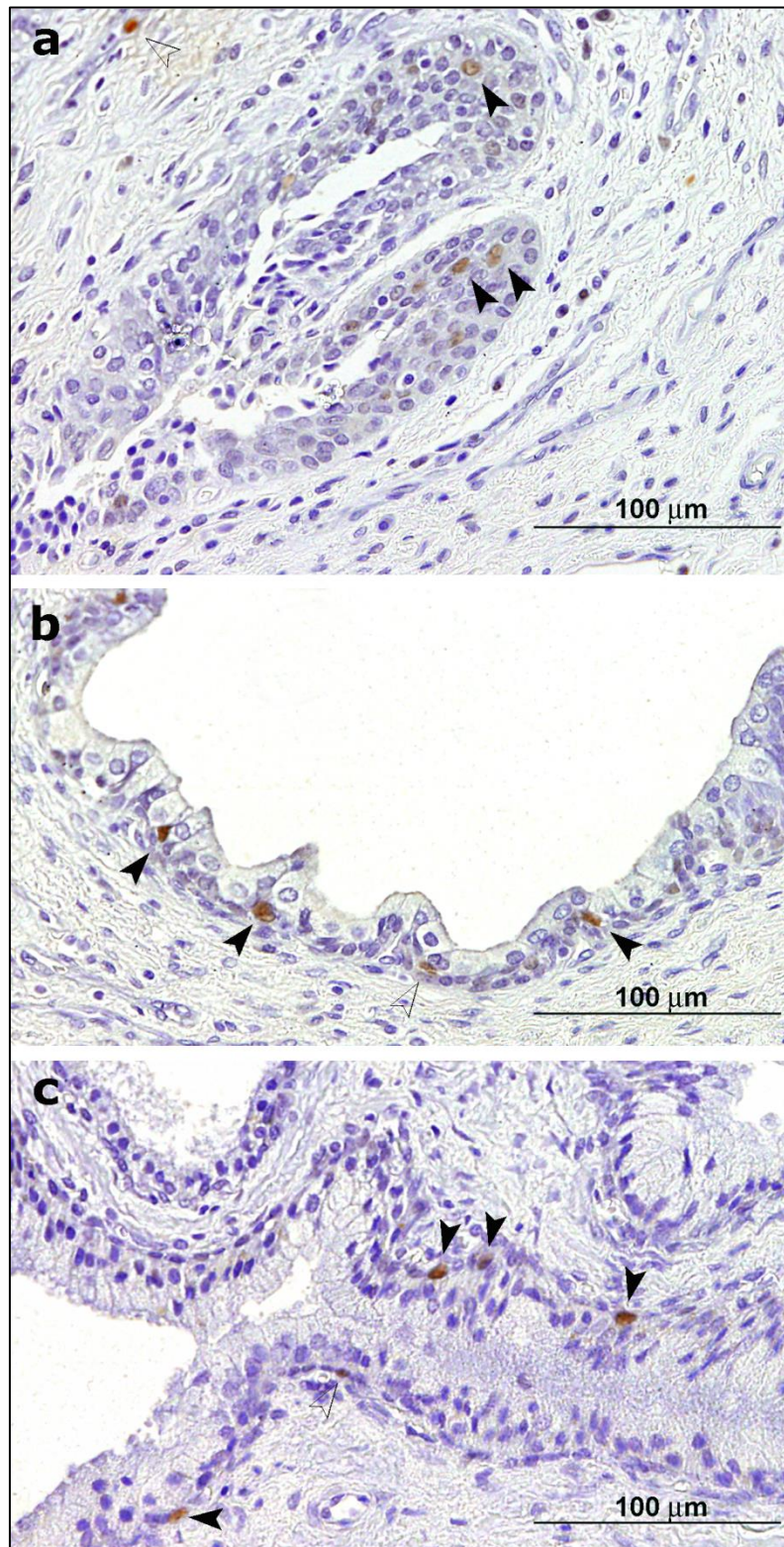
En el grupo control se observa una escasa cantidad de núcleos en fase de proliferación, correspondiendo éstos fundamentalmente a células epiteliales del estrato basal, aunque también es posible encontrar otro tipo de células en proliferación, tanto células epiteliales columnares como células en el componente estromal de forma muy ocasional (fig. 14a-c). Aunque la cantidad es escasa en todas las regiones de las próstatas del grupo control, es posible identificar una mayor cantidad de células epiteliales inmunoteñidas en las glándulas de la región transicional, probablemente debido a precisar un mayor recambio por su cercanía con la uretra (fig. 14a).

En el grupo hiperplasia se observa una mayor cantidad y tamaño de estructuras glandulares y como consecuencia de células epiteliales totales, pero la proporción de células epiteliales inmunoteñidas para PCNA con respecto a las totales parece similar a la que encontramos en la región transicional de las próstatas del grupo control (fig. 15a,b).

En el grupo de adenocarcinoma, se observa una mayor cantidad de células epiteliales totales, así como una mayor proporción de células epiteliales inmunoteñidas para PCNA con respecto a las totales. Además, estas células pueden adoptar una disposición poco habitual, infiltrando en forma de pequeños grupos celulares el estroma sin poder identificarse la luz de la glándula (fig. 15c,d).

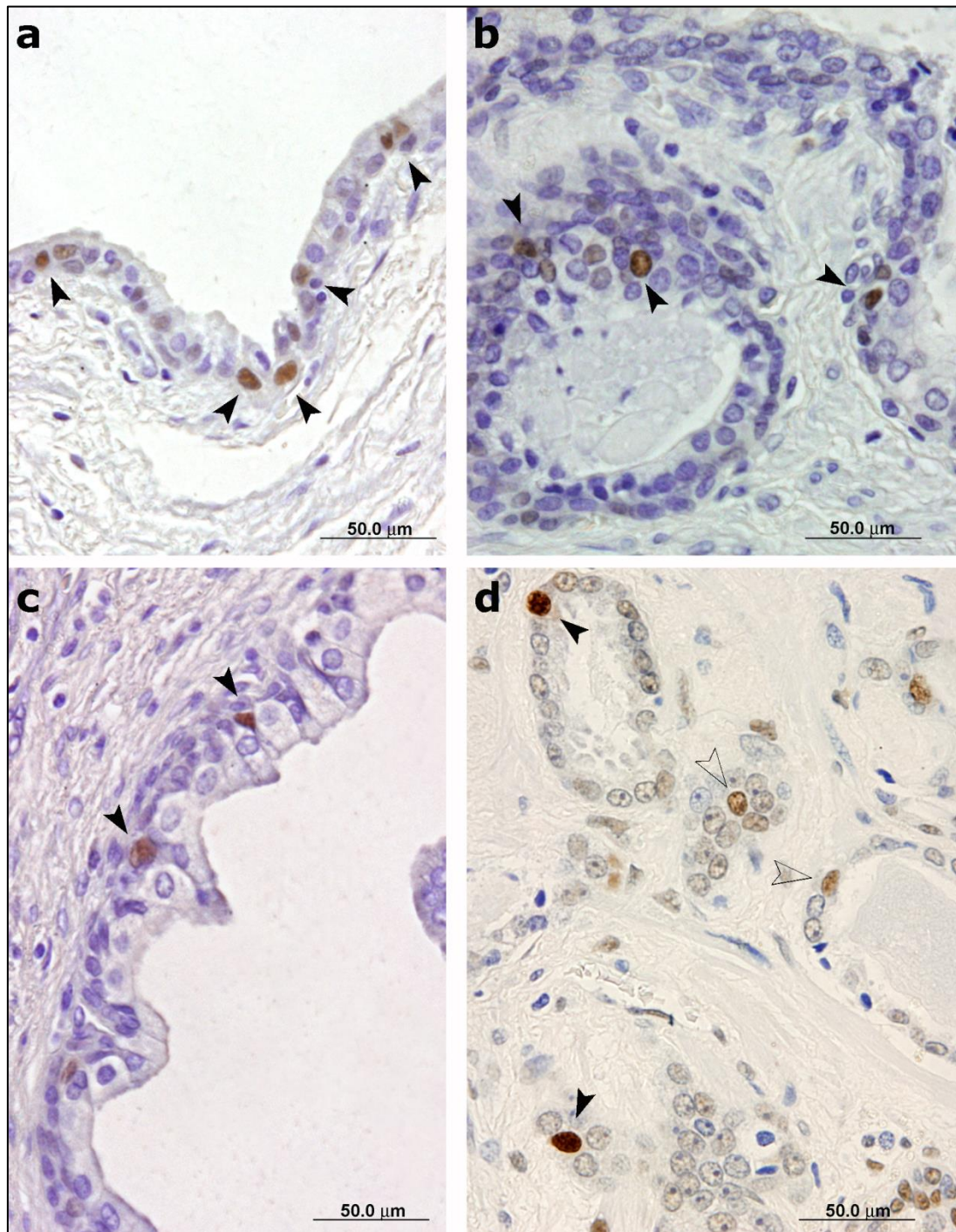
En todos los grupos es posible identificar distintos tipos de inmunorreactividad a PCNA, observándose una gradación en la tinción, aunque este efecto es más patente en las muestras de adenocarcinoma. Así, es posible ver núcleos con una tinción homogénea caracterizada por un color marrón oscuro, o una tinción granular, con núcleos de color marrón claro (fig. 15d).





**Figura 14.** Inmunotinción para proliferación celular (PCNA) en próstatas de grupo control: **a)** región transicional donde se observan inmunotinción de células del epitelio glandular (punta de flecha negra) y pertenecientes al estroma (punta de flecha vacía); **b)** región periférica con inmunotinción de células columnares (punta de flecha negra) y células basales (punta de flecha vacía); **c)** región central con inmunotinción de células columnares (flecha negra) y células basales (punta de flecha vacía).





**Figura 15.** Inmunotinción para proliferación celular (PCNA) en próstatas de grupo control, hiperplasia y adenocarcinoma: **a)** región transicional de próstata del grupo control con células epiteliales inmunoteñidas para PCNA (punta de flecha negra); **b)** hiperplasia de próstata con células epiteliales inmunoteñidas para PCNA (punta de flecha negra); **c)** región periférica de próstata del grupo control con células epiteliales inmunoteñidas para PCNA (punta de flecha negra); **d)** adenocarcinoma de próstata con células epiteliales inmunoteñidas para PCNA con diferentes grados de tinción (punta de flecha negra y punta de flecha vacía).

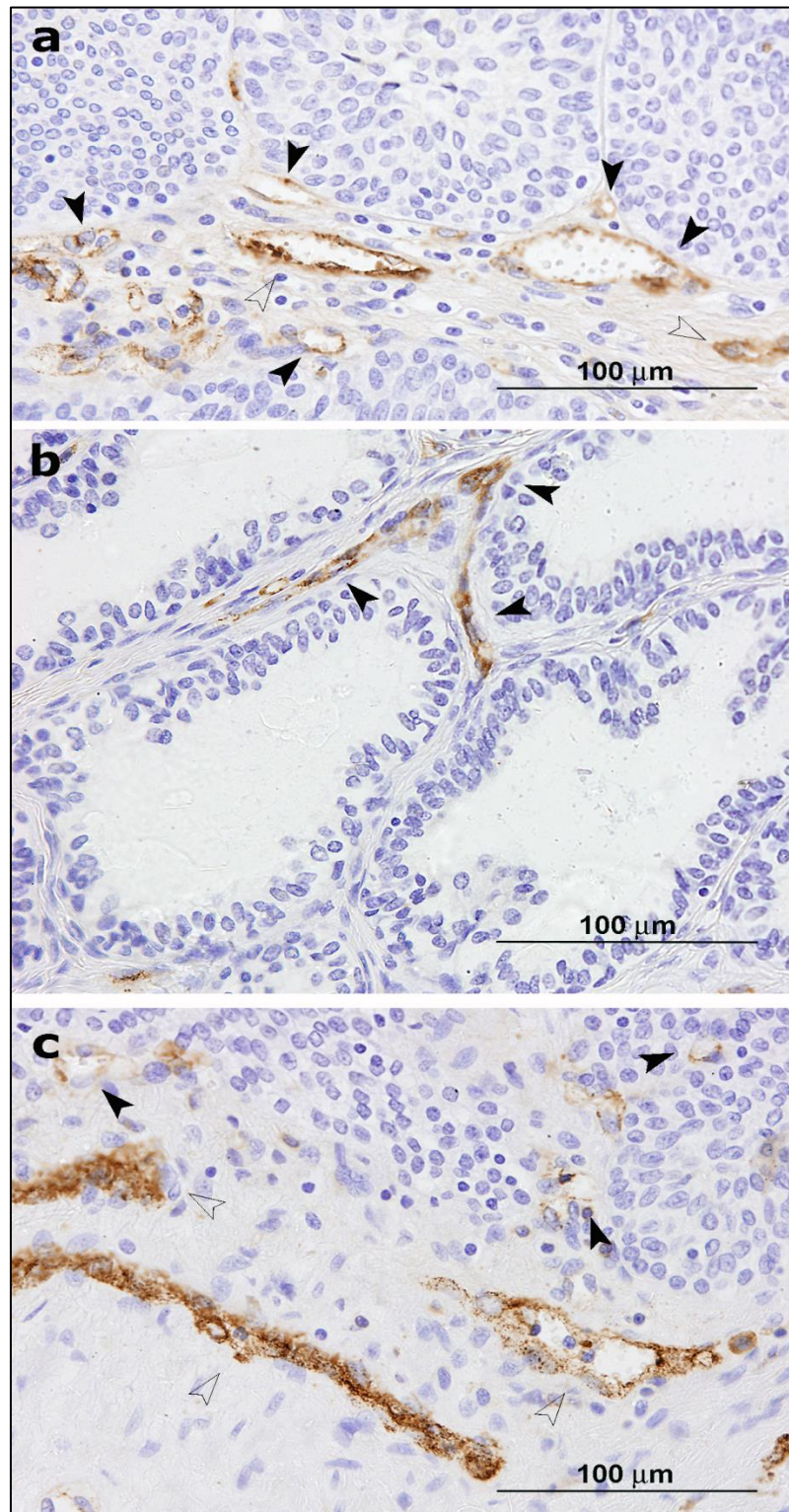


## **2.2. Inmunotinción microvasos (Factor VIII):**

En el grupo control se observa una distribución más o menos homogénea de los capilares en las diferentes regiones prostáticas, encontrándose en la totalidad del tejido prostático, pero sobre todo en el estroma periglandular. La mayoría de los microvasos inmunorreactivos se observan en contacto con la membrana basal de los acinos (fig. 16).

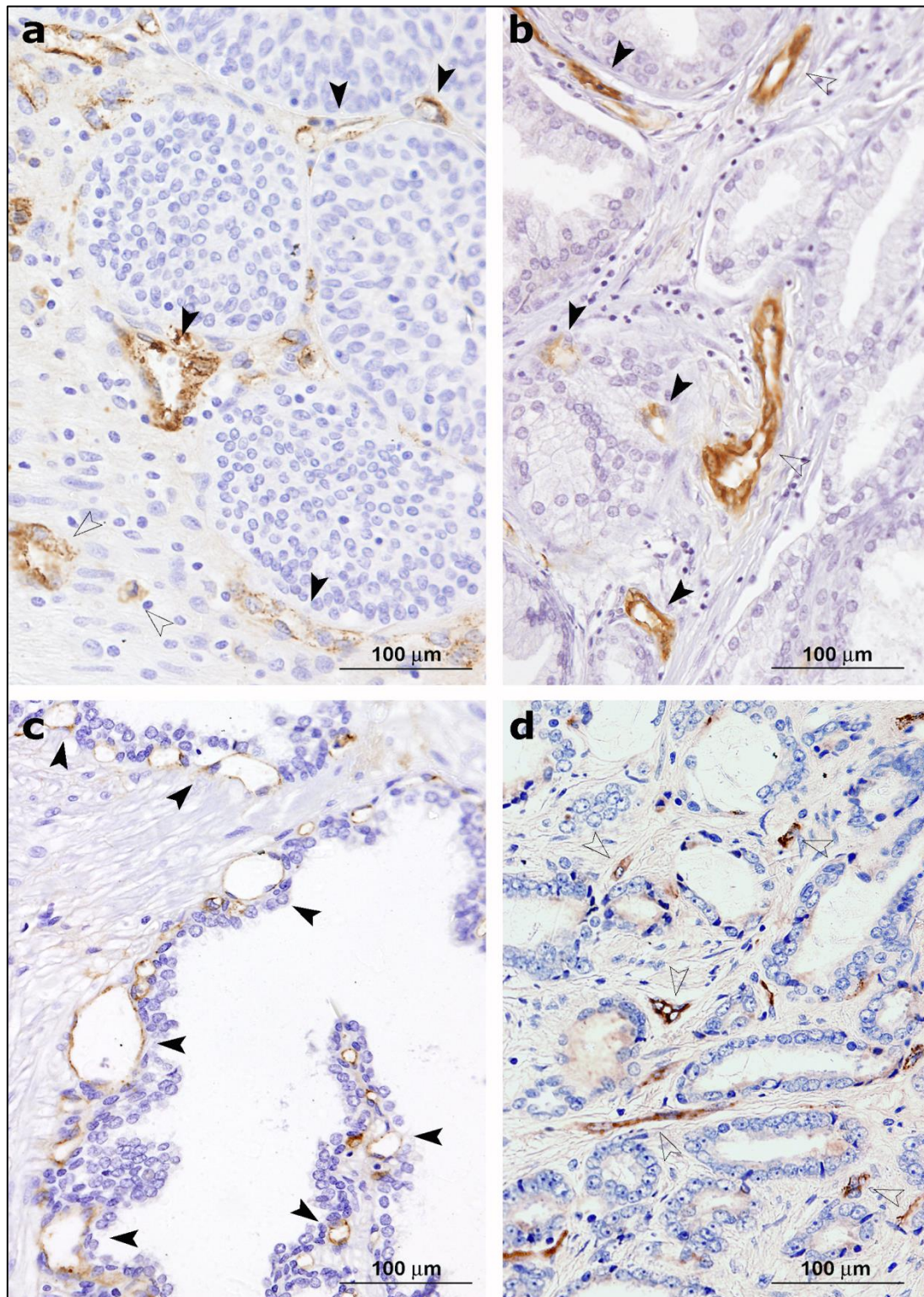
En el grupo hiperplasia es posible identificar una mayor cantidad de estructuras vasculares inmunoteñidas en comparación con la región transicional del grupo control. Esta mayor cantidad de microvasos se observa fundamentalmente en la zona transicional de las próstatas hiperplásicas, donde se aprecia el principal crecimiento de la zona glandular. Así como en los controles, se identifican microvasos en contacto con los acinos prostáticos, aunque también otros más alejados de los mismos distribuidos en el estroma periglandular (fig. 17a,b).

En el grupo de adenocarcinoma, se identifica una mayor proporción de microvasos inmunorreactivos al compararlos con los presentes en la región periférica de los controles. Se distribuyen principalmente en el estroma tumoral, y aunque es posible observar algunos de éstos microvasos en contacto con los acinos, se localizan fundamentalmente en el estroma periglandular. La estructura de los microvasos en las muestras de adenocarcinoma se objetiva irregular, con mayores ramificaciones, y distintos tamaños (fig. 17c,d).



**Figura 16.** Inmunotinción para microvasos (Factor VIII) en próstatas de grupo control: **a)** región transicional con acinos prostáticos con capilares en contacto directo con los mismos (punta flecha negra) y capilares estromales periglandulares (punta flecha vacía); **b)** región periférica con acinos prostáticos con importante luz glandular y escaso estroma entre los mismos, con capilares en contacto con los acinos (punta flecha negra); **c)** región central con acino prostático con capilares en contacto (punta flecha negra) y periglandulares (punta flecha vacía).





**Figura 17.** Inmunotinción para microvasos (Factor VIII) en próstatas de grupo control, hiperplasia y adenocarcinoma: **a)** región transicional de grupo control con acinos prostáticos y capilares en contacto (punta flecha negra) y periglandulares (punta flecha vacía); **b)** grupo hiperplasia con mayor cantidad de acinos prostáticos, con capilares en contacto con el acino (punta flecha negra) y en estroma periglandular (punta flecha vacía); **c)** región periférica de grupo control con numerosos microvasos rodeando las estructuras glandulares y en contacto directo con las mismas (punta flecha negra); **d)** grupo adenocarcinoma con presencia de microvasos en mayor número que en región periférica, de menor tamaño, y con distribución principalmente periglandular (punta flecha vacía), sin contacto con los acinos.

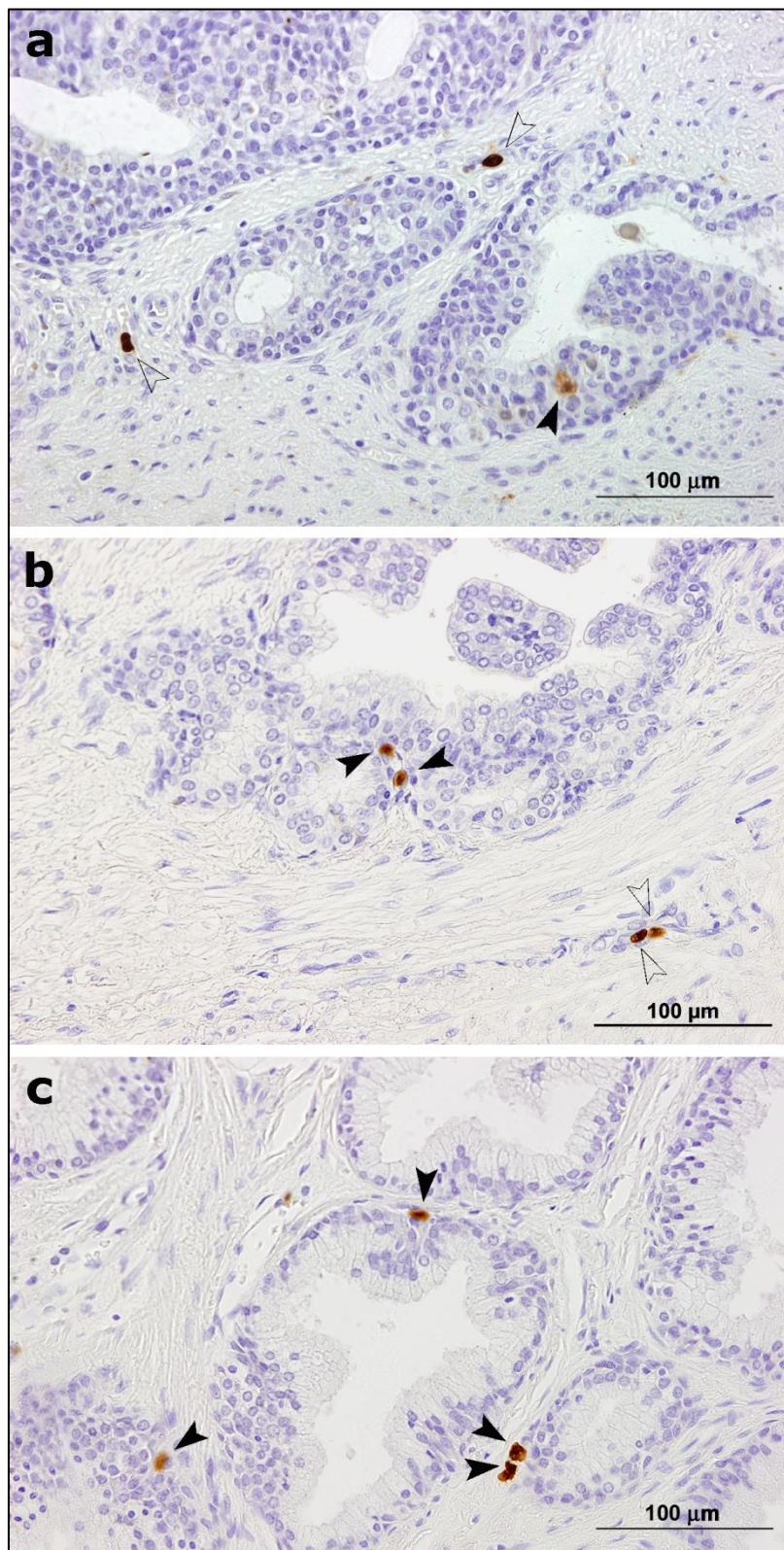
### **2.3. Inmunotinción macrófagos (MAC-387):**

En el grupo control se observan macrófagos presentes en todas las regiones prostáticas, tanto estromales como epiteliales, aunque es posible identificar una mayor proporción de macrófagos estromales en la región transicional y mayor proporción de macrófagos epiteliales en la región central. La región periférica presenta una proporción similar de macrófagos estromales y epiteliales. Es posible identificar macrófagos epiteliales tanto en la porción basal de las glándulas como en porciones más apicales (Fig. 18).

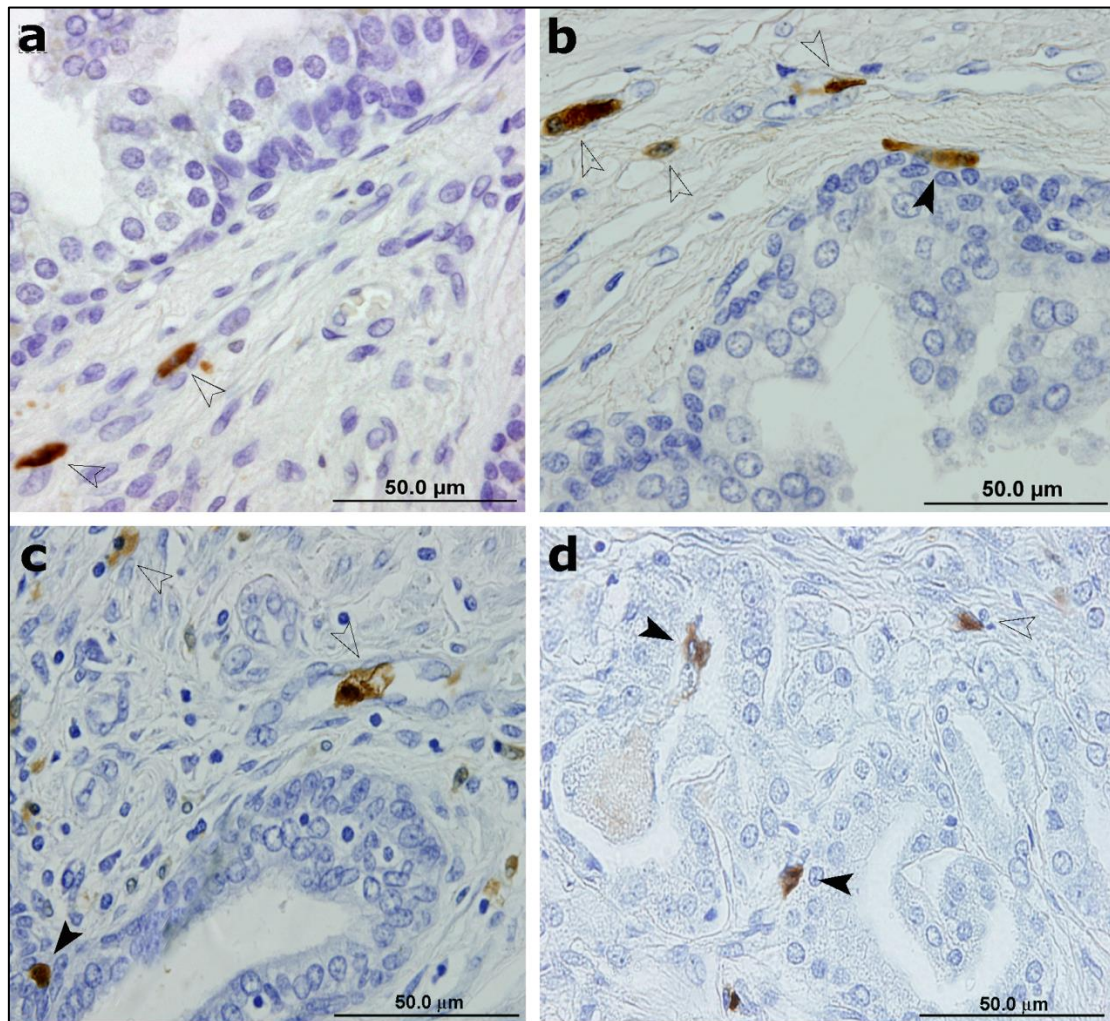
En el grupo hiperplasia se observan macrófagos tanto en el compartimento glandular como en el estromal, pero se encuentra mayor proporción de éstos en el compartimento estromal que en la zona de transición del grupo control (fig. 19a,b).

En el grupo de adenocarcinoma, también es posible identificar macrófagos en ambos compartimentos, aunque se observa mayor proporción de macrófagos epiteliales que estromales al compararlo con la zona periférica del grupo control (fig. 19c,d).





**Figura 18.** Inmunotinción para macrófagos (MAC-387) en próstatas de grupo control: **a)** región transicional con macrófagos en compartimento epitelial (punta de flecha negra) y estromal (punta de flecha vacía); **b)** región periférica con macrófagos en compartimento epitelial (punta de flecha negra) y estromal (punta de flecha vacía); **c)** región central con macrófagos en compartimento epitelial (punta de flecha negra).



**Figura 19.** Inmunotinción para macrófagos (MAC-387) en próstatas de grupo control, hiperplasia y adenocarcinoma: **a)** región transicional de grupo control con macrófagos en compartimento estromal (punta de flecha vacía); **b)** grupo hiperplasia con macrófagos en compartimento epitelial (punta de flecha negra) y estromal (punta de flecha vacía); **c)** región periférica de grupo control con macrófagos en compartimento epitelial (punta de flecha negra) y estromal (punta de flecha vacía); **d)** grupo adenocarcinoma con macrófagos fundamentalmente en compartimento epitelial (punta de flecha negra) y sólo un macrófago en compartimento estromal (punta de flecha vacía).

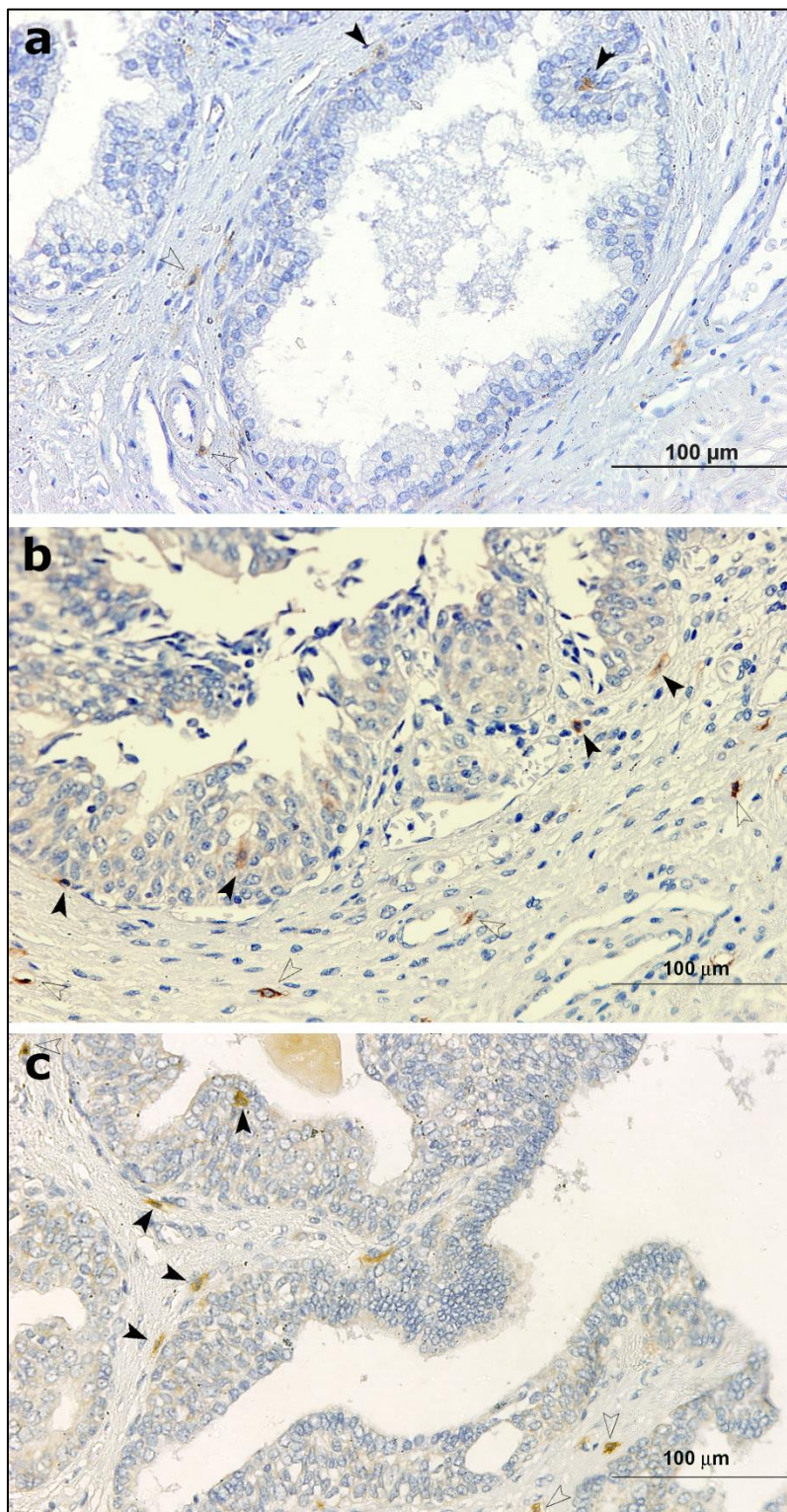


## **2.4. Inmunotinción mastocitos (C-KIT):**

En el grupo control se observan mastocitos inmunorreactivos para C-KIT distribuidos por todo el tejido prostático, pudiendo encontrarlos en el tejido estromal interglandular y periglandular, en el epitelio glandular o incluso en la luz de las glándulas. Los mastocitos localizados en el epitelio glandular parecen encontrarse en la misma proporción en las diferentes regiones prostáticas, mientras que se aprecia una mayor proporción de mastocitos periglandulares en la región transicional, y una menor proporción de ellos en la región periférica (fig. 20).

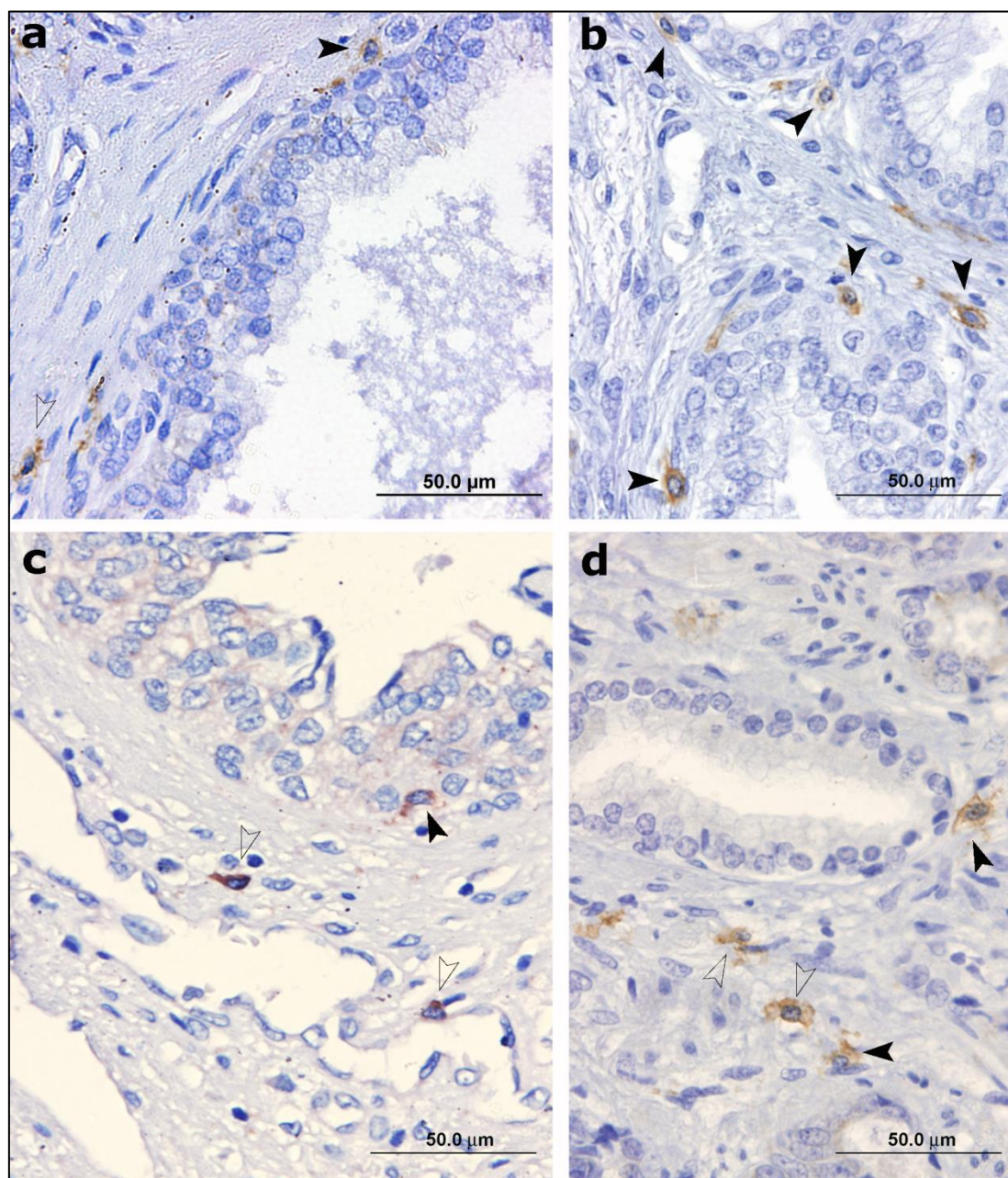
En el grupo hiperplasia se observan también mastocitos en los compartimentos estromal, periglandular y glandular, sin poder apreciarse diferencias en cuanto a su distribución con respecto al grupo control (fig. 21a,b).

En el grupo de adenocarcinoma se encuentran mastocitos en los compartimentos estromal, periglandular y glandular, sin poder apreciarse diferencias en cuanto a su distribución con respecto al grupo control (fig. 21c,d).



**Figura 20.** Inmunotinción para mastocitos (C-KIT) en próstatas de grupo control: **a)** región transicional con mastocitos periglandulares e intraepiteliales (punta de flecha negra) y estromales (punta de flecha vacía); **b)** región periférica con mastocitos periglandulares e intraepiteliales (punta de flecha negra) y estromales (punta de flecha vacía); **c)** región central con mastocitos periglandulares e intraepiteliales (punta de flecha negra) y estromales (punta de flecha vacía).





**Figura 21.** Inmunotinción para mastocitos (C-KIT) en próstatas de grupo control, hiperplasia y adenocarcinoma: **a)** región transicional de grupo control con mastocitos periglandulares (punta de flecha negra) y estromales (punta de flecha vacía); **b)** grupo hiperplasia con mastocitos intraepiteliales y periglandulares (punta de flecha negra); **c)** región periférica de grupo control con mastocitos intraepiteliales (punta de flecha negra) y estromales (punta de flecha vacía); **d)** grupo adenocarcinoma con mastocitos periglandulares (punta de flecha negra) y estromales (punta de flecha vacía).

### 3. ESTUDIO CUANTITATIVO.

#### 3.1. Tablas de contingencia:

Se realizaron tablas de contingencia de cada variable agrupando las mismas en intervalos cuyo punto de corte era el percentil 50, y se compararon en el grupo control entre regiones y entre los diferentes grupos de estudio mediante la prueba de  $\chi^2$ . Las siguientes tablas (tablas 7 y 8) muestran los puntos de corte para cada una de las variables.

Variables relativas	≤ P50	> P50
$L_V$ (mm <sup>-2</sup> )	≤ 112.00	> 112.00
LI PCNA	≤ 0.42	> 0.42
$N_V$ mcstrom (nº de macrófagos x10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	≤ 3.40	> 3.40
$N_V$ mcep (nº de macrófagos x10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	≤ 6.10	> 6.10
$N_V$ ceb (nº de mastocitos x10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	≤ 5.20	> 5.20
$N_V$ cebpg (nº de mastocitos x10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	≤ 9.10	> 9.10
$N_V$ ep (nº de c. epiteliales x10 <sup>6</sup> / mm <sup>3</sup> )	≤ 1.02	> 1.02
$V_V$ mcstrom (x10 <sup>-4</sup> )	≤ 6.88	> 6.88
$V_V$ mcep (x10 <sup>-4</sup> )	≤ 4.00	> 4.00

**Tabla 7.** Puntos de corte de las variables relativas agrupadas según el percentil 50 (P50). En la primera columna se indica entre paréntesis las unidades en que se expresa cada variable.

Variables absolutas	≤ P50	> P50
L (Km)	≤ 0.81	> 0.81
$N$ mcstrom (nº de macrófagos x10 <sup>6</sup> )	≤ 11.50	> 11.50
$N$ mcep (nº de macrófagos x10 <sup>6</sup> )	≤ 9.73	> 9.73
$N$ ceb (nº de mastocitos x10 <sup>6</sup> )	≤ 23.84	> 23.84
$N$ cebpg (nº de mastocitos x10 <sup>6</sup> )	≤ 36.54	> 36.54
$N$ ep (nº de c. epiteliales x10 <sup>9</sup> )	≤ 2.00	> 2.00
$U_N$ mcstrom (μm <sup>3</sup> )	≤ 144.00	> 144.00
$U_N$ mcep (μm <sup>3</sup> )	≤ 49.00	> 49.00

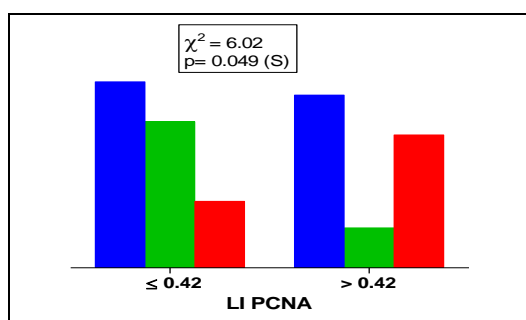
**Tabla 8.** Puntos de corte de las variables absolutas agrupadas según el percentil 50 (P50). En la primera columna se indica entre paréntesis las unidades en que se expresa cada variable.

### 3.1.1. Densidad numérica de células epiteliales e índice de marcaje de proliferación celular.

Al agruparse las variables índice de marcaje de epitelio con PCNA, densidad numérica y número absoluto de células epiteliales en intervalos cuyo punto de corte es el percentil 50, se observa una diferencia significativa entre los diferentes casos (control, HBP y cáncer) en las variables índice de marcaje de PCNA y número absoluto de células epiteliales (Figs. 22 y 23).

En el caso del índice de marcaje se observó mayor presencia de casos por encima del percentil 50 en el grupo de cáncer, y mayor presencia de casos por debajo del percentil 50 en el grupo de hiperplasia benigna de próstata.

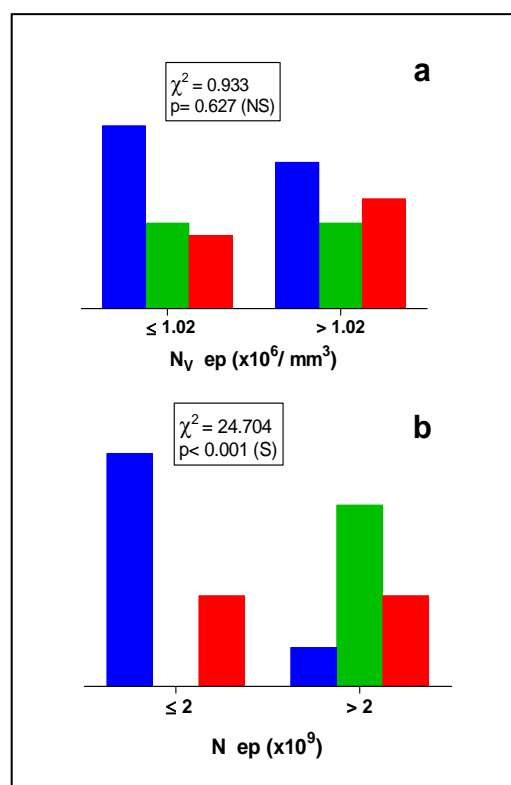
Con respecto al número absoluto de células epiteliales, se observa una mayor presencia de éstas por debajo del percentil 50 en el grupo control, mientras que hay una mayor presencia por encima del percentil 50 en el grupo hiperplasia benigna de próstata.



**Figura 22.** Diagrama de barras que muestra el índice de marcaje de PCNA en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con punto de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ .

**Figura 23.** Diagramas de barras que muestran la densidad numérica (a) y el número absoluto (b) de células epiteliales en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con puntos de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ .

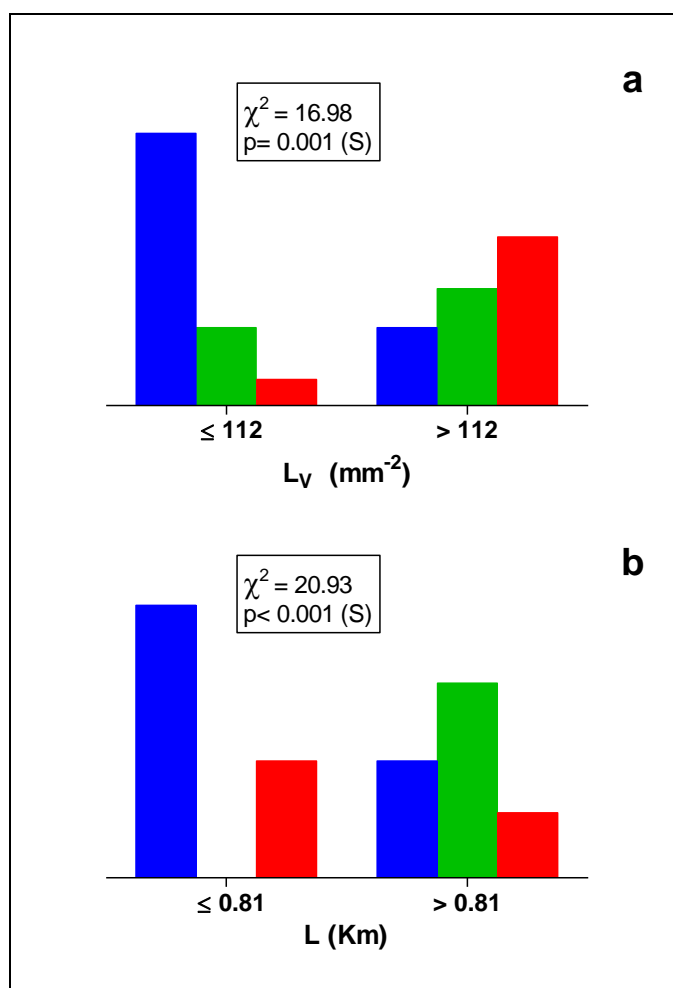
Código de colores: azul grupo control, verde grupo HBP, rojo grupo cáncer.



### 3.1.2. Densidad de longitud y longitud absoluta de microvasos.

Al agrupar las variables densidad lineal y longitud absoluta vascular en intervalos con punto de corte el percentil 50, se observó diferencia significativa en ambos casos (Fig. 24).

Se encontró una mayor presencia de casos del grupo control en ambas variables por debajo del percentil 50. En cambio, se encontró una mayor presencia de casos de HBP por encima del percentil 50 en la variable longitud absoluta, mientras que en la variable densidad de longitud el mayor porcentaje de casos que se encontraban por encima del percentil 50 correspondían al grupo de cáncer.



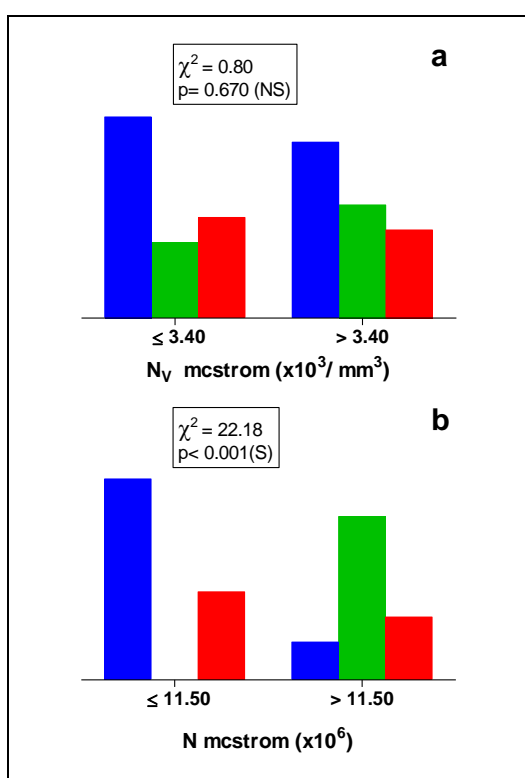
**Figura 24.** Diagramas de barras que muestran la densidad de longitud **(a)** y longitud absoluta **(b)** en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con puntos de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ . Código de colores: azul grupo control, verde grupo HBP, rojo grupo cáncer.

### 3.1.3. Densidad numérica y número absoluto de macrófagos.

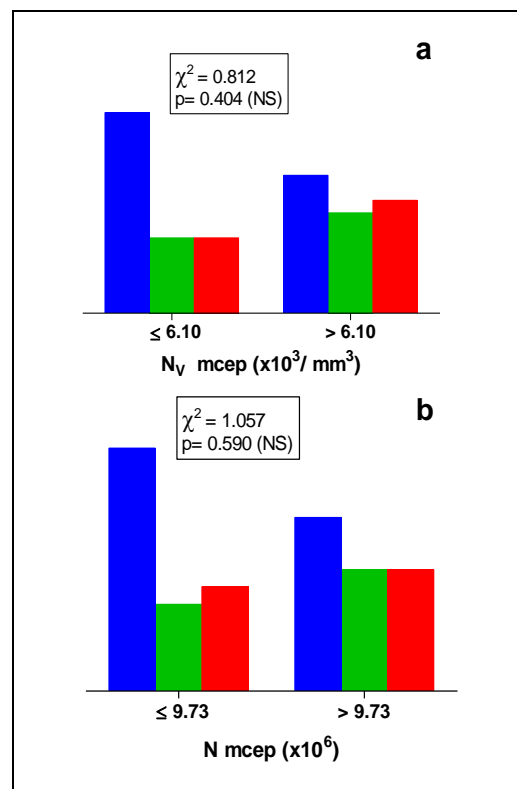
En cuanto a la cuantificación de macrófagos, al agrupar las variables densidad numérica y número absoluto de macrófagos estromales y epiteliales por intervalos con punto de corte el percentil 50, sólo se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el número absoluto de macrófagos estromales.

Se observó mayor número absoluto de macrófagos estromales por debajo del percentil 50 en los casos del grupo control, mientras que existía un mayor número absoluto de macrófagos estromales por encima del percentil 50 en los casos del grupo HBP.

No hubo diferencias significativas en las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de macrófagos epiteliales y número absoluto de macrófagos epiteliales (Figs. 25 y 26).



**Figura 25.** Diagramas de barras que muestran la densidad numérica **(a)** y el número absoluto **(b)** de macrófagos estromales en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con punto de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ . Código de colores: azul grupo control, verde grupo HBP, rojo grupo cáncer.



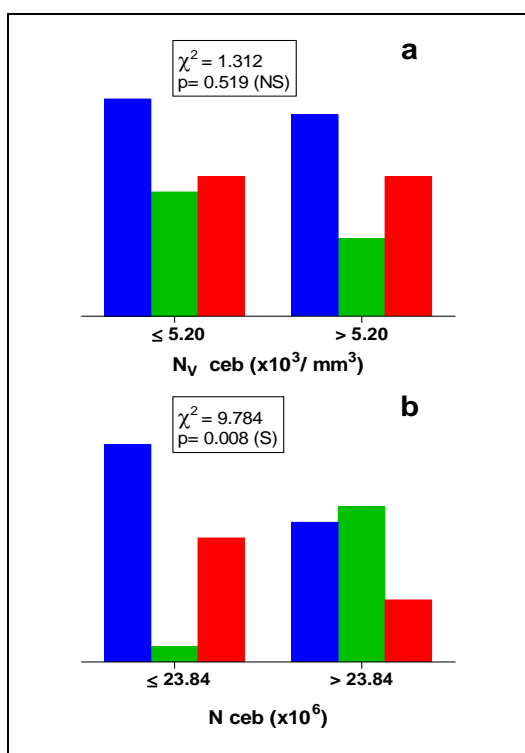
**Figura 26.** Diagramas de barras que muestran la densidad numérica **(a)** y el número absoluto **(b)** de macrófagos epiteliales en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con punto de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ . Código de colores: azul grupo control, verde grupo HBP, rojo grupo cáncer.

### 3.1.4. Densidad numérica y número absoluto de mastocitos.

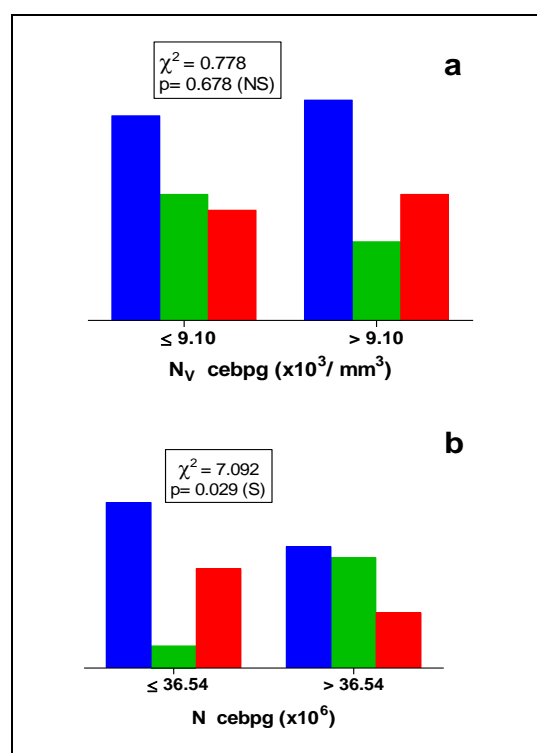
Al comparar las variables densidad numérica y número absoluto de mastocitos totales y periglandulares agrupados por intervalos con punto de corte percentil 50, sólo se obtuvieron diferencias significativas en la variable número absoluto de mastocitos totales y periglandulares.

En cuanto al número absoluto de mastocitos totales, se observó mayor número de mastocitos por encima del percentil 50 en el grupo HBP, mientras que había un mayor número de ellos por debajo del percentil 50 en los grupos control y cáncer.

En la variable número absoluto de mastocitos periglandulares, se observó mayor cantidad de mastocitos periglandulares por debajo del percentil 50 en el grupo control y cáncer, y mayor presencia de mastocitos periglandulares por encima del percentil 50 en el grupo HBP (Figs. 27 y 28).



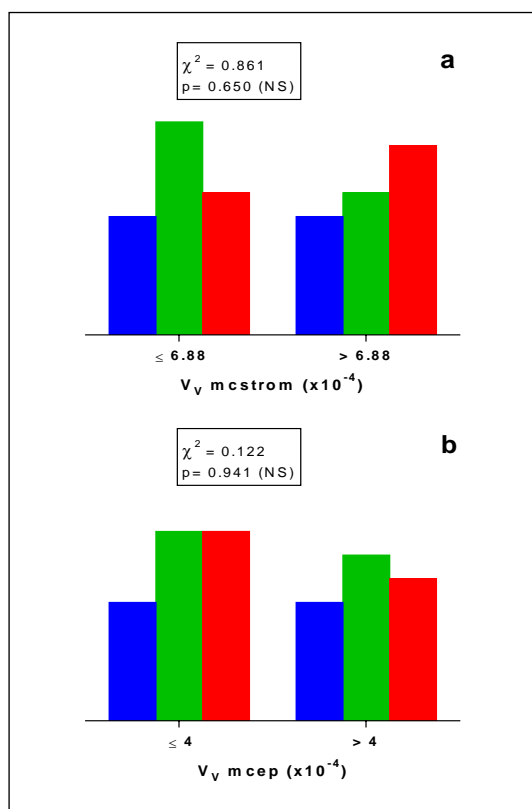
**Figura 27.** Diagramas de barras que muestran la densidad numérica (a) y el número absoluto (b) de mastocitos en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con punto de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ . Código de colores: azul grupo control, verde grupo HBP, rojo grupo cáncer.



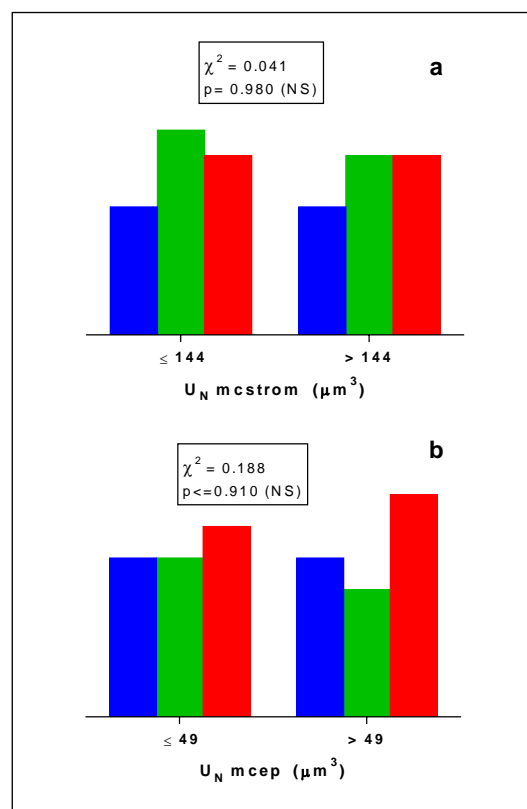
**Figura 28.** Diagramas de barras que muestran la densidad numérica (a) y el número absoluto (b) de mastocitos periglandulares en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con punto de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ . Código de colores: azul grupo control, verde grupo HBP, rojo grupo cáncer.

### 3.1.5. Fracción de volumen de macrófagos.

No hubo diferencia significativas al comparar las variables fracción de volumen y volumen celular promedio de macrófagos estromales y epiteliales en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con punto de corte percentil 50 (Figs. 29 y 30).



**Figura 29.** Diagramas de barras que muestran la fracción de volumen de macrófagos estromales **(a)** y macrófagos epiteliales **(b)** en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con punto de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ . Código de colores: azul grupo control, verde grupo HBP, rojo grupo cáncer.



**Figura 30.** Diagramas de barras que muestran el volumen celular promedio de macrófagos estromales **(a)** y macrófagos epiteliales **(b)** en los diferentes grupos, agrupados por intervalos con punto de corte P50, mediante la prueba de  $\chi^2$ . Código de colores: azul grupo control, verde grupo HBP, rojo grupo cáncer.

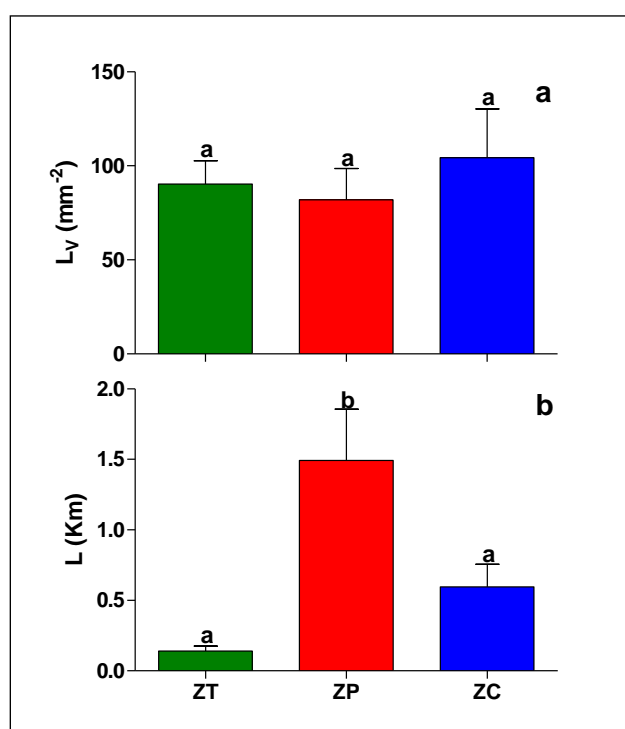
### 3.2. Análisis de la Varianza:

#### ➤ **CONTROLES**

Se realizó un análisis de la varianza de las medias de las diferentes variables en las tres regiones prostáticas de los casos del grupo control y se aplicó el Test de Student-Newman-Keuls para la comparación múltiple de medias entre las distintas regiones.

#### 3.2.1. Densidad de longitud y longitud absoluta de vasos:

En cuanto a la comparación de medias de la variable densidad de longitud de vasos en las diferentes regiones de las próstatas control no se observaron diferencias significativas, mientras que en la variable longitud absoluta se objetivó una diferencia estadísticamente significativa con mayor longitud media de vasos en la zona periférica (Fig. 31).



**Figura 31.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de las variables densidad de longitud (a) y longitud absoluta (b) de microvasos entre las diferentes regiones del grupo control (zona transicional ZT, zona periférica ZP y zona central ZC). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

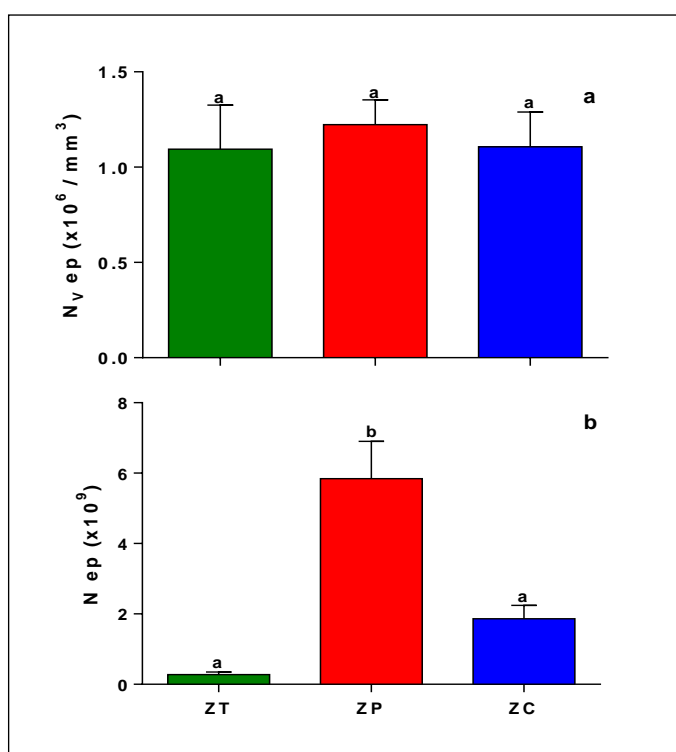


### 3.2.2. Densidad numérica y número absoluto de células epiteliales e índice marcaje PCNA:

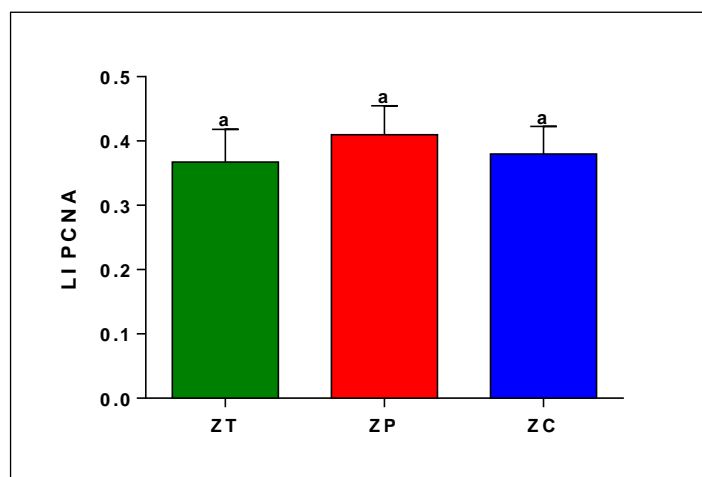
La comparación de medias de la variable densidad numérica de células epiteliales no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes regiones (Fig. 32a).

La variable número absoluto de células epiteliales sí mostró diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes regiones, observándose una mayor cantidad media en la región periférica, y una menor cantidad media en las regiones central y transicional (Fig. 32b).

La comparación de medias de la variable índice de marcaje de PCNA no mostró diferencias estadísticamente significativas en dicho análisis entre las diferentes zonas (Fig. 33).



**Figura 32.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de las variables densidad numérica de células epiteliales (a) y número absoluto (b) de células epiteliales en las diferentes regiones del grupo control (zona transicional ZT, zona periférica ZP y zona central ZC). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.



**Figura 33.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM del índice de marcaje para PCNA del epitelio en las diferentes regiones del grupo control (zona transicional ZT, zona periférica ZP y zona central ZC). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

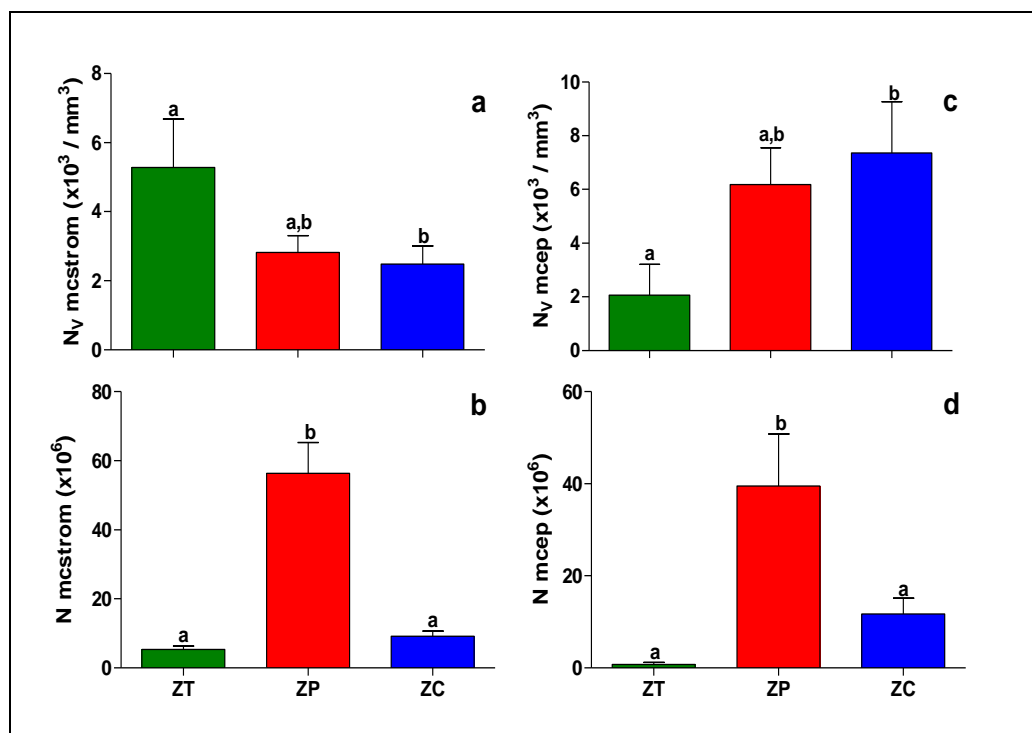
### 3.2.3. Densidad numérica y número absoluto de macrófagos:

La comparación de medias de la variable densidad numérica de macrófagos estromales en las diferentes regiones de las próstatas control mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose una mayor densidad numérica media en la región transicional y una menor densidad numérica media en la región central (Fig. 34a).

La comparación de medias de la variable número absoluto de macrófagos estromales también mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose una mayor cantidad media en la región periférica, y menor en las regiones transicional y central (Fig. 34b).

En cuanto a los macrófagos epiteliales, la comparación de medias de la variable densidad numérica mostró diferencias estadísticamente significativas entre la región transicional y central, no habiendo diferencias en cambio con la región periférica. Se observó una mayor densidad numérica media en la región central, y una menor densidad numérica media en la región transicional (Fig. 34c).

La comparación de medias de la variable número absoluto de macrófagos epiteliales mostró diferencias significativas entre las regiones, objetivándose una mayor cantidad media en la región periférica y una menor cantidad media en las regiones central y transicional (Fig. 34d).



**Figura 34.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de las variables densidad numérica (a) y número absoluto (b) de macrófagos estromales y densidad numérica (c) y número absoluto (d) de macrófagos epiteliales en las diferentes regiones del grupo control (zona transicional ZT, zona periférica ZP y zona central ZC). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

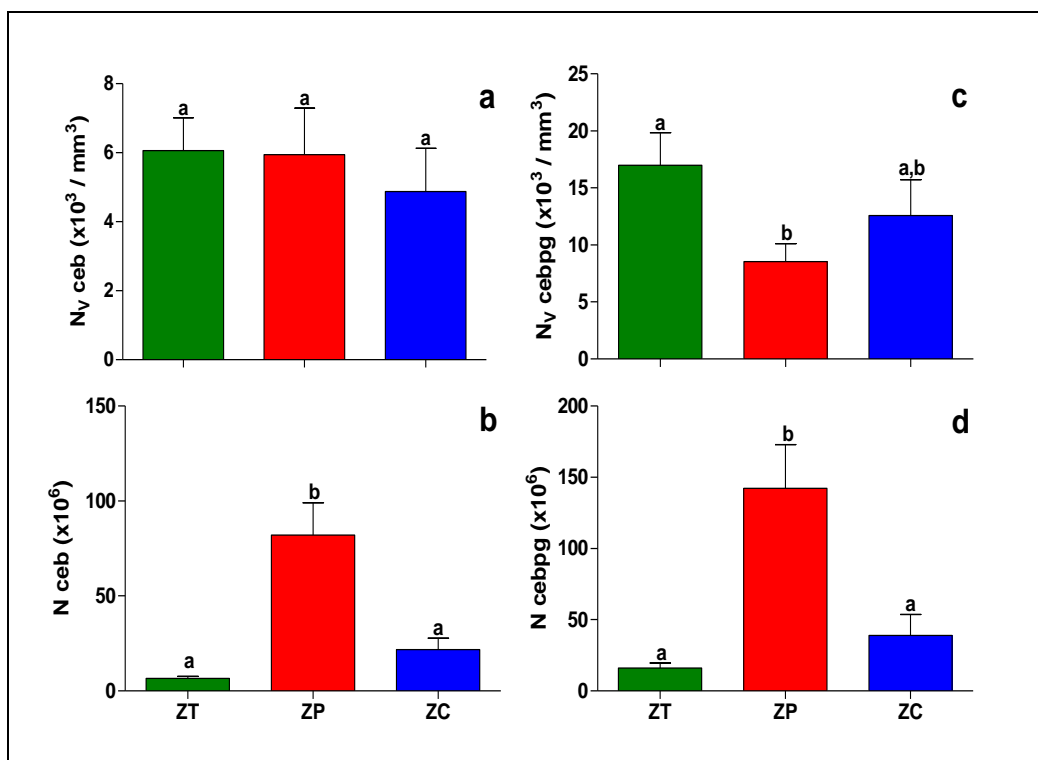
### 3.2.4. Densidad numérica y número absoluto de mastocitos:

La comparación del análisis de la varianza de la variable densidad numérica de mastocitos totales en las diferentes regiones de las próstatas control no mostró diferencias estadísticamente significativas (Fig. 35a).

En cuanto a la variable número absoluto de mastocitos totales mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose una mayor cantidad media en la región periférica, y menor en las regiones transicional y central (Fig. 35b).

En el análisis de los mastocitos periglandulares, la comparación de la variable densidad numérica mostró diferencias significativas entre la región transicional y periférica, no habiendo diferencias en cambio con la región central. Se observó una mayor densidad numérica media en la región transicional, y una menor densidad media en la región periférica (Fig. 35c).

La comparación de la variable número absoluto de mastocitos periglandulares mostró diferencias estadísticamente significativas entre las distintas regiones, con mayor cantidad de mastocitos en la región periférica y menor en las regiones transicional y central (Fig. 35d).



**Figura 35.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de las variables densidad numérica (a) y número absoluto (b) de mastocitos totales y densidad numérica (c) y número absoluto (d) de mastocitos periglandulares en las diferentes regiones del grupo control (zona transicional ZT, zona periférica ZP y zona central ZC), Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

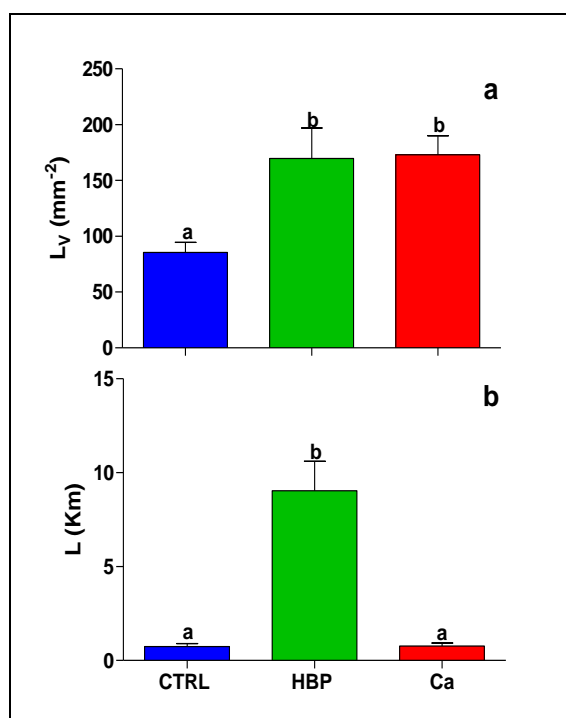
## ➤ CASOS

Se realizó un análisis de la varianza de las medias de las diferentes variables y se aplicó el Test de Student-Newman-Keuls para la comparación múltiple de medias entre los distintos grupos de estudio (controles, HBP y carcinoma).

### 3.2.5. Densidad de longitud y longitud absoluta de vasos:

En cuanto a la comparación de medias de la variable densidad de longitud de vasos en los diferentes grupos de estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas, encontrándose una mayor densidad de longitud media en los grupos hiperplasia y cáncer con respecto al grupo control (Fig. 36a).

En la variable longitud absoluta se objetivó una diferencia estadísticamente significativa identificándose una mayor longitud absoluta media de vasos en el grupo hiperplasia con respecto a los grupos control y cáncer (Fig. 36b).



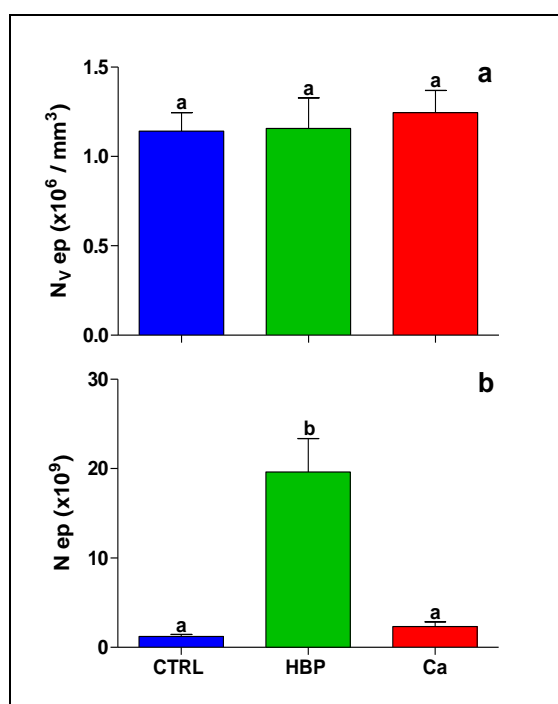
**Figura 36.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de las variables densidad de longitud (a) y longitud absoluta (b) de microvasos, entre los diferentes grupos de estudio (CTRL, HBP y Ca). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

### 3.2.6. Densidad numérica y número absoluto de células epiteliales e índice de marcaje de PCNA:

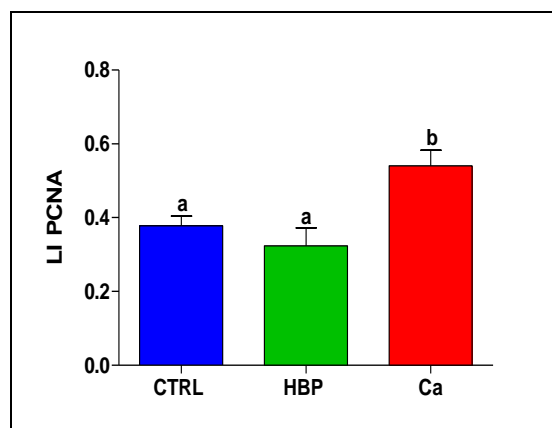
La comparación de medias de la variable densidad numérica de células epiteliales entre los diferentes grupos de estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas (Fig. 37a).

La variable número absoluto de células epiteliales sí mostró diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, observándose una mayor cantidad media en el grupo hiperplasia, y una menor cantidad media en los grupos control y cáncer (Fig. 37b)

La comparación de medias de la variable índice de marcaje de PCNA mostró diferencias estadísticamente significativas en dicho análisis entre los diferentes grupos, apreciándose un mayor índice de marcaje de PCNA medio en el grupo cáncer con respecto a los grupos control e hiperplasia (Fig. 38).



**Figura 37.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de las variables densidad numérica (a) y número absoluto (b) de células epiteliales, entre los diferentes grupos de estudio (CTRL, HBP y Ca). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.



**Figura 38.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM del índice de marcaje para PCNA de las células epiteliales entre los diferentes grupos de estudio (CTRL, HBP y Ca). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

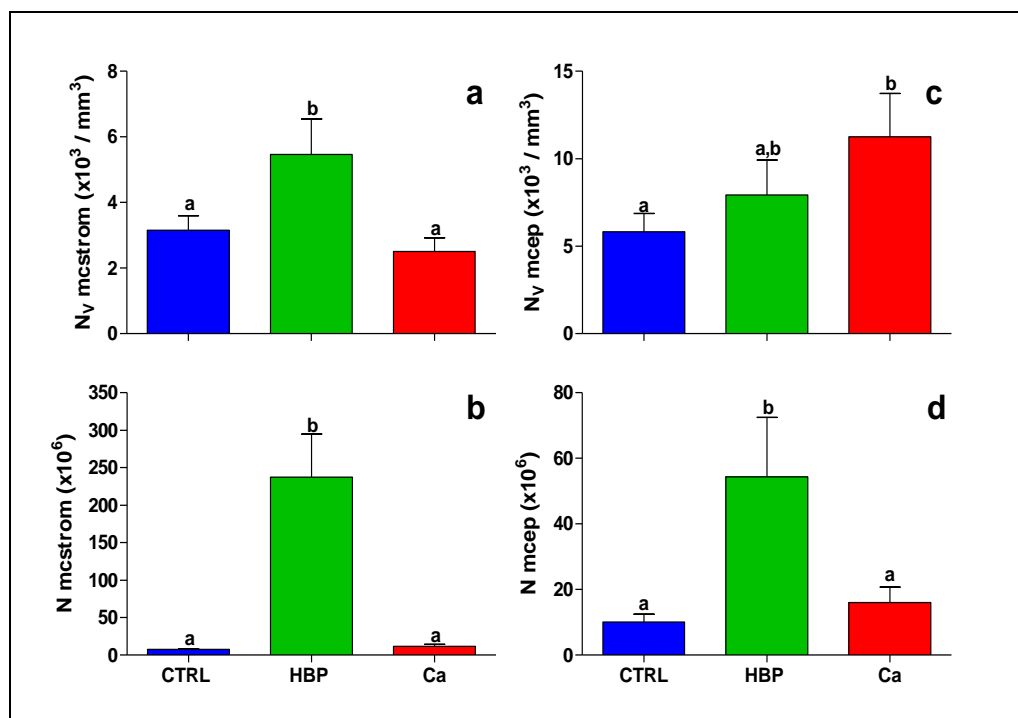
### 3.2.7. Densidad numérica y número absoluto de macrófagos:

La comparación de medias de la variable densidad numérica de macrófagos estromales en los diferentes grupos de estudio mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose una mayor densidad numérica media de macrófagos estromales en el grupo hiperplasia con respecto a los grupos control y cáncer (Fig. 39a).

La comparación de la variable número absoluto de macrófagos estromales también mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose una mayor cantidad media en el grupo hiperplasia con respecto a los grupos control y cáncer (Fig. 39b).

En cuanto a los macrófagos epiteliales, la comparación de medias de la variable densidad numérica mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos, objetivándose una mayor densidad numérica media en el grupo cáncer y una menor densidad numérica media en el grupo control. No hubo diferencias en cambio con el grupo hiperplasia (Fig. 39c).

La comparación de medias de la variable número absoluto de macrófagos epiteliales mostró diferencias significativas entre los grupos, evidenciándose una mayor cantidad media en el grupo hiperplasia y una menor cantidad media en los grupos control y cáncer (Fig. 39d).



**Figura 39.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de las variables densidad numérica (a) y número absoluto (b) de macrófagos estromales y densidad numérica (c) y número absoluto (d) de macrófagos epiteliales entre los diferentes grupos de estudio (CTRL, HBP y Ca). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

### 3.2.8. Densidad numérica y número absoluto de mastocitos:

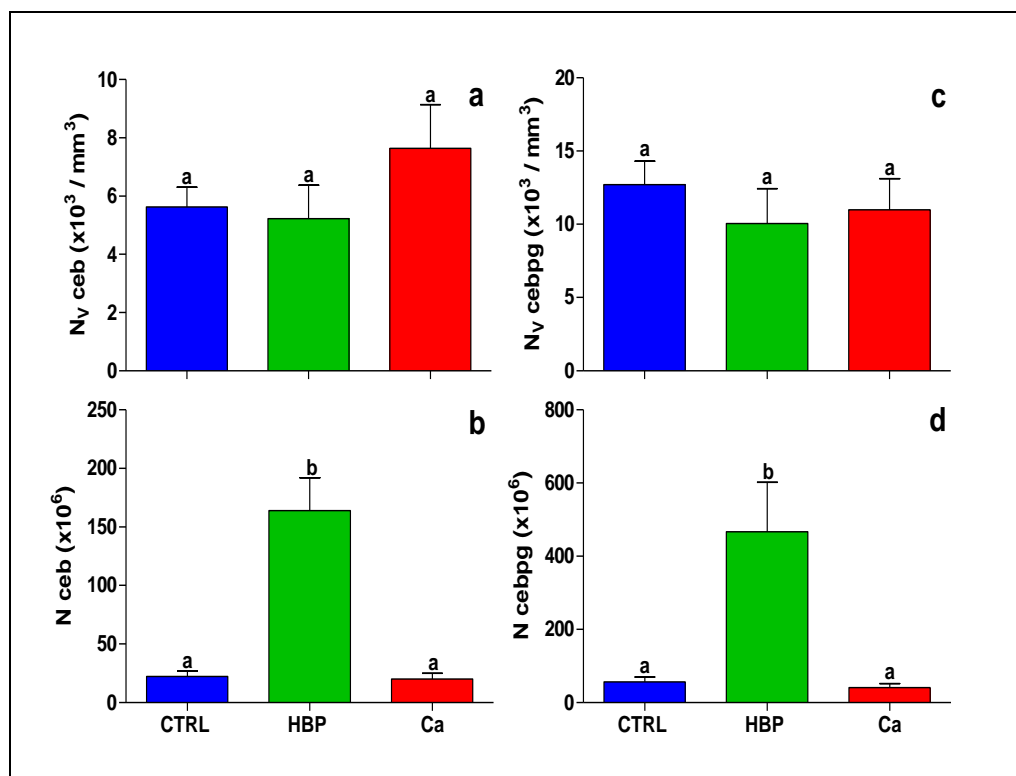
La comparación de medias de la variable densidad numérica de mastocitos totales en los diferentes grupos de estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas (Fig. 40a).

En cuanto a la comparación de la variable número absoluto de mastocitos totales mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose una mayor cantidad media en el grupo hiperplasia, y menor en los grupos control y cáncer (Fig. 40b).

En el análisis de los mastocitos periglandulares, la comparación de medias de la variable densidad numérica no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos (Fig. 40c).

La comparación de medias de la variable número absoluto de mastocitos periglandulares mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose una mayor cantidad media en el grupo hiperplasia y una menor cantidad media en los grupos control y cáncer (Fig. 40d).



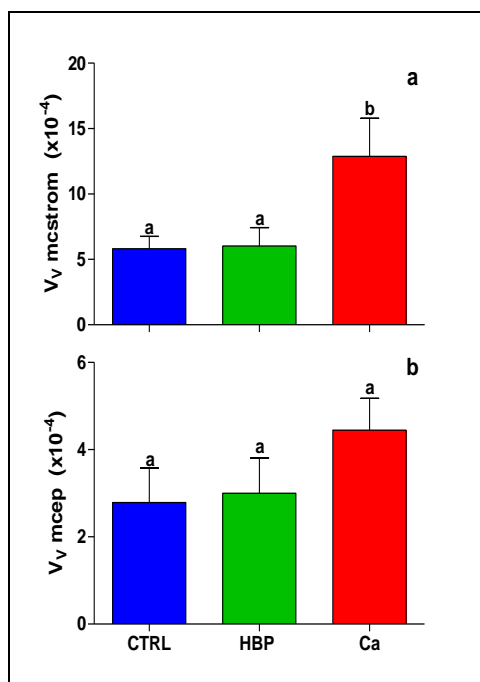


**Figura 40.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de las variables densidad numérica (a) y número absoluto (b) de mastocitos totales y densidad numérica (c) y número absoluto (d) de mastocitos periglandulares entre los diferentes grupos de estudio (CTRL, HBP y Ca). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

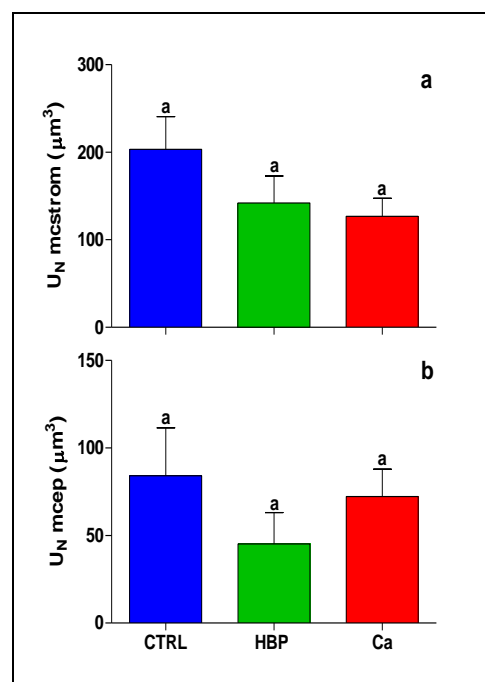
### 3.2.9. Fracción de volumen y volumen celular promedio de macrófagos:

La comparación de medias de la variable fracción de volumen de macrófagos estromales en los diferentes grupos mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose una mayor fracción de volumen media en el grupo cáncer con respecto a los grupos control e hiperplasia (Fig. 41a). En el caso de la variable fracción de volumen de macrófagos epiteliales no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de medias (Fig. 41b).

La comparación de medias de la variable volumen celular promedio en macrófagos estromales y macrófagos epiteliales en los diferentes grupos de estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas (Fig. 42).



**Figura 41.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de la fracción de volumen de macrófagos estromales (a) y macrófagos epiteliales (b) entre los diferentes grupos de estudio (CTRL, HBP y Ca). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.



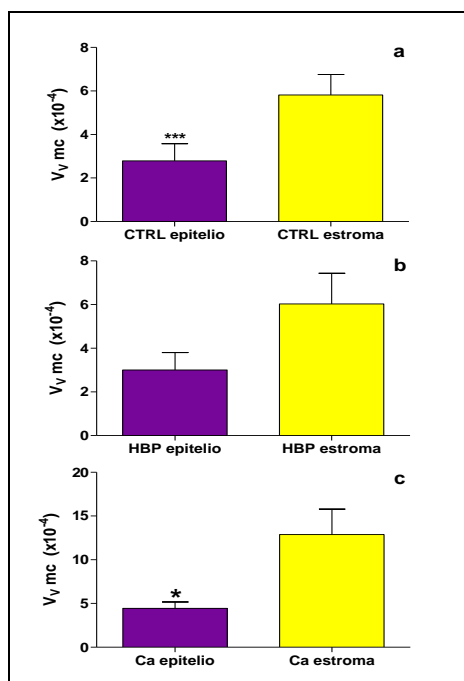
**Figura 42.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de la variable volumen celular promedio de macrófagos estromales (a) y macrófagos epiteliales (b) entre los diferentes grupos de estudio (CTRL, HBP y Ca). Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significación.

### ➤ **FRACCIÓN DE VOLUMEN Y VOLUMEN CELULAR PROMEDIO DE MACRÓFAGOS POR COMPARTIMENTOS**

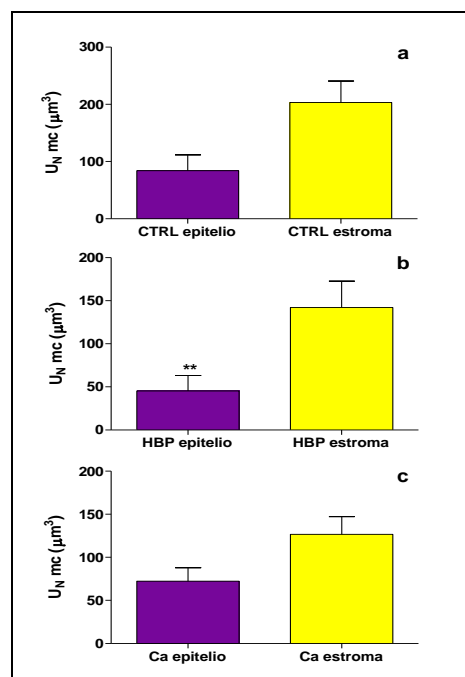
Se realizó un análisis de la varianza de las medias de las variables fracción de volumen y volumen celular promedio de macrófagos en los compartimentos estromal y epitelial entre los distintos grupos de estudio y se aplicó el Test de la t de Student para la comparación de medias.

La comparación de medias de la variable fracción de volumen de macrófagos en los compartimentos estromal y epitelial mostró diferencias estadísticamente significativas en el grupo control y cáncer, encontrándose en ambos casos una menor fracción de volumen en el compartimento epitelial. No hubo diferencias significativas en el grupo hiperplasia (Fig. 43).

En la variable volumen celular promedio de macrófagos en ambos compartimentos hubo diferencias estadísticamente significativas en el grupo hiperplasia, encontrándose un menor volumen celular promedio de macrófagos en el compartimento epitelial con respecto al estromal (Fig. 44).



**Figura 43.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de la variable fracción de volumen de macrófagos en el compartimento estromal y epitelial entre los diferentes grupos de estudio: CTRL (a), HBP (b) y Ca (c). Los asteriscos situados sobre las barras de error manifiestan la significación estadística (\* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0001$ ).



**Figura 44.** Diagramas de barras que representan la media  $\pm$  SEM de la variable volumen celular promedio de macrófagos en el compartimento estromal y epitelial entre los diferentes grupos de estudio: CTRL (a), HBP (b) y Ca (c). Los asteriscos situados sobre las barras de error manifiestan la significación estadística (\* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0001$ ).

### 3.3. Estudio de correlación de variables.

Para analizar la relación entre las diferentes variables en cada uno de los grupos de estudio se realizó un test de correlación de Pearson. En el caso de las variables que demostraron una relación estadísticamente significativa se realizó un análisis de regresión lineal.

Sólo se realizó el estudio de correlación entre las variables relativas, ya que la correlación en el caso de las variables absolutas, al ser variables que tiene en cuenta el volumen de referencia, éste puede actuar como factor de confusión.

#### ➤ **CONTROLES**

En las tablas 9 y 10 se muestran los resultados de la correlación entre las distintas parejas de variables junto a su significación estadística.

Variables correlacionadas	R	P	Significación
$L_V \leftrightarrow LI\ PCNA$	0.397	0.049	S
$L_V \leftrightarrow N_V\ mcstrom$	0.472	0.013	S
$L_V \leftrightarrow N_V\ mcep$	0.264	0.213	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ ceb$	-0.079	0.701	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ cebpg$	-0.044	0.832	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ ep$	0.183	0.380	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ mcstrom$	0.426	0.027	S
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ mcep$	0.205	0.316	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.249	0.241	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.342	0.102	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ ep$	0.283	0.153	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ mcep$	0.513	0.006	S
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.084	0.678	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.207	0.301	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ ep$	0.147	0.465	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.362	0.082	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.107	0.618	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.089	0.665	NS
$N_V\ ceb \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.615	0.001	S
$N_V\ ceb \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.234	0.272	NS
$N_V\ cebpg \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.142	0.507	NS

**Tabla 9.** Correlación de pares de variables relativas en el grupo CTRL. Se indican las parejas de variables correlacionadas; el coeficiente de correlación de Pearson (R); el nivel de significación (p) y si la correlación es significativa (S) o no significativa (NS).

Variables correlacionadas	R	P	Significación
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow L_V$	-0.318	0.445	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow \text{LI PCNA}$	-0.016	0.972	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ mcstrom}$	0.029	0.944	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ mcep}$	-0.414	0.267	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ ceb}$	-0.725	0.027	S
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ cebpg}$	0.387	0.303	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ ep}$	0.632	0.067	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow V_V \text{ mcep}$	0.915	0.001	S
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow L_V$	-0.161	0.701	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow \text{LI PCNA}$	0.266	0.563	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ mcstrom}$	0.118	0.153	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ mcep}$	-0.507	0.199	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ ceb}$	-0.695	0.037	S
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ cebpg}$	0.386	0.303	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ ep}$	0.523	0.148	NS

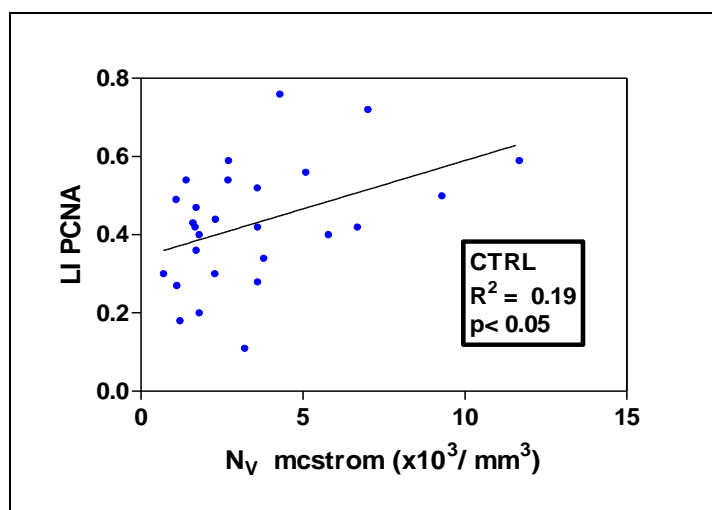
**Tabla 10.** Correlación de pares de variables relativas en el grupo CTRL. Se indican las parejas de variables correlacionadas; el coeficiente de correlación de Pearson (R); el nivel de significación (p) y si la correlación es significativa (S) o no significativa (NS).

Tras el análisis de correlación de Pearson se obtuvo una relación estadísticamente significativa entre los siguientes pares de variables:

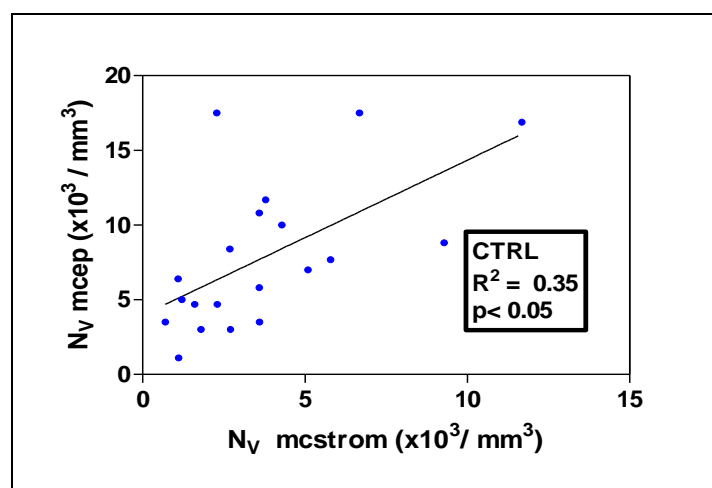
- Densidad de longitud de vasos e índice de marcaje de PCNA.
- Densidad de longitud de vasos y densidad numérica de macrófagos estromales.
- Índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de macrófagos estromales.
- Densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales.
- Densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de mastocitos periglandulares.
- Fracción de volumen de macrófagos estromales y densidad numérica de mastocitos.
- Fracción de volumen de macrófagos estromales y fracción de volumen de macrófagos epiteliales.
- Fracción de volumen de macrófagos epiteliales y densidad numérica de mastocitos.

Sobre los pares de variables que mostraron una relación estadísticamente significativa se realizó un análisis de regresión lineal.

La variable densidad numérica de macrófagos estromales presentó una correlación positiva con las variables índice de marcaje de PCNA (Fig. 45) y densidad numérica de macrófagos epiteliales (Fig. 46).

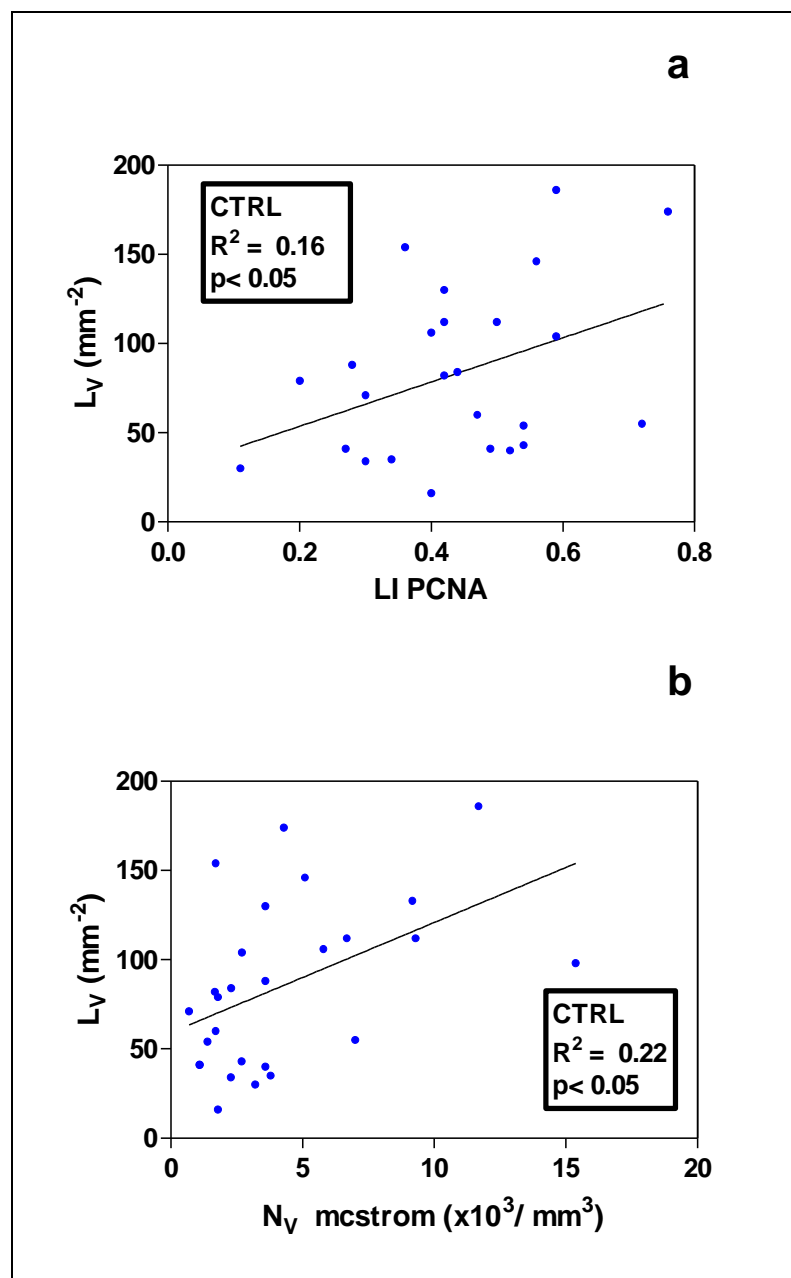


**Figura 45.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad numérica de macrófagos estromales e índice de marcaje de PCNA en el grupo control.



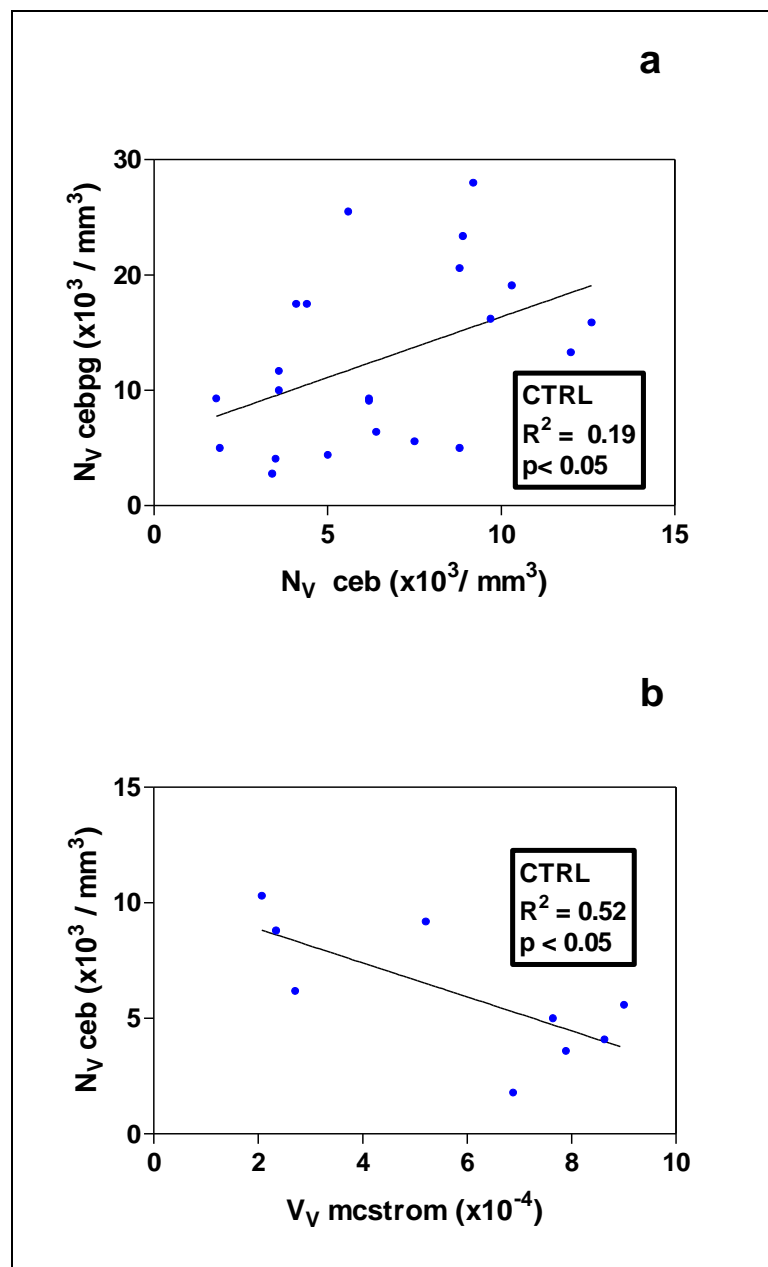
**Figura 46.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales en el grupo control.

La variable densidad de longitud de vasos mostró una correlación positiva con las variables índice de marcaje de PCNA (Fig. 47a) y densidad numérica de macrófagos estromales (Fig. 47b).



**Figura 47.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad de longitud de vasos e índice de marcaje de PCNA (a) y densidad de longitud de vasos y densidad numérica de macrófagos estromales (b) en el grupo control.

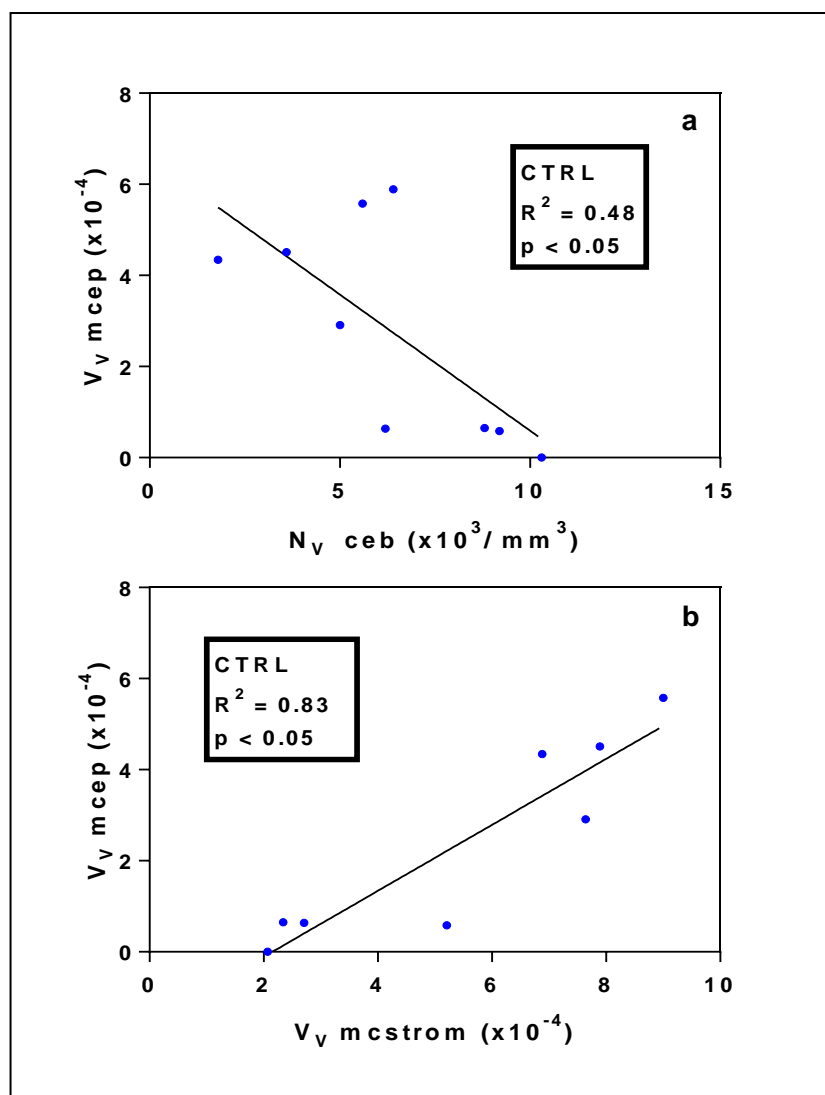
La variable densidad numérica de mastocitos totales mostró una correlación positiva con la variable densidad numérica de mastocitos periglandulares (Fig. 48a), mientras que la correlación con la variable fracción de volumen de macrófagos estromales fue negativa (Fig. 48b).



**Figura 48.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad numérica de mastocitos totales y densidad numérica de mastocitos periglandulares (a) y densidad numérica de mastocitos totales y fracción de volumen de macrófagos estromales (b) en el grupo control.



La variable fracción de volumen de macrófagos epiteliales mostró una correlación negativa con la variable densidad numérica de mastocitos totales (Fig. 49a), mientras que la correlación con la variable fracción de volumen de macrófagos estromales fue positiva (Fig. 49b).



**Figura 49.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad numérica de mastocitos totales y fracción de volumen de macrófagos epiteliales (a) y fracción de volumen de macrófagos epiteliales y fracción de volumen de macrófagos estromales (b) en el grupo control.

➤ **HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA:**

En las tablas 11 y 12 se muestran los resultados de la correlación entre las distintas parejas de variables junto a su significación estadística.

Variables correlacionadas	R	P	Significación
$L_V \leftrightarrow LI\ PCNA$	0.475	0.086	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ mcstrom$	0.315	0.252	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ mcep$	0.240	0.409	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.260	0.392	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.277	0.359	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ ep$	0.340	0.234	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ mcstrom$	-0.196	0.501	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ mcep$	-0.226	0.457	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.102	0.752	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ cebpg$	-0.034	0.917	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ ep$	0.294	0.330	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ mcep$	0.858	< 0.0001	S
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.541	0.056	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.260	0.392	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.023	0.937	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.398	0.200	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ cebpg$	-0.119	0.713	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.137	0.656	NS
$N_V\ ceb \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.768	0.002	S
$N_V\ ceb \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.230	0.450	NS
$N_V\ cebpg \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.184	0.548	NS

**Tabla 11.** Correlación de pares de variables relativas en el grupo HBP. Se indican las parejas de variables correlacionadas; el coeficiente de correlación de Pearson (R); el nivel de significación (p) y si la correlación es significativa (S) o no significativa (NS).

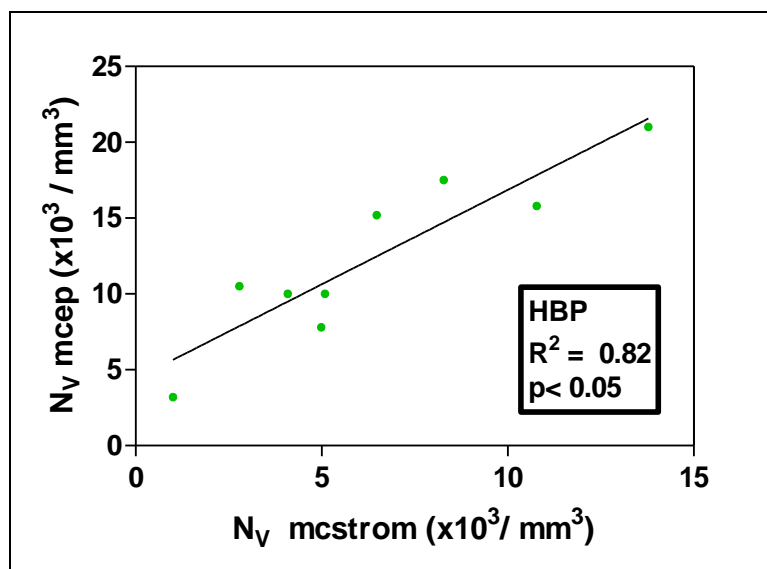
Variables correlacionadas	R	P	Significación
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow L_V$	-0.122	0.677	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow \text{LI PCNA}$	0.253	0.403	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ mcstrom}$	0.060	0.838	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ mcep}$	-0.021	0.943	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ ceb}$	0.059	0.854	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ cebpg}$	-0.012	0.969	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ ep}$	-0.465	0.109	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow V_V \text{ mcep}$	0.034	0.919	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow L_V$	-0.170	0.595	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow \text{LI PCNA}$	0.324	0.303	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ mcstrom}$	-0.282	0.373	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ mcep}$	-0.213	0.528	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ ceb}$	0.111	0.743	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ cebpg}$	-0.244	0.468	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ ep}$	0.362	0.246	NS

**Tabla 12.** Correlación de pares de variables relativas en el grupo HBP. Se indican las parejas de variables correlacionadas; el coeficiente de correlación de Pearson (R); el nivel de significación (p) y si la correlación es significativa (S) o no significativa (NS).

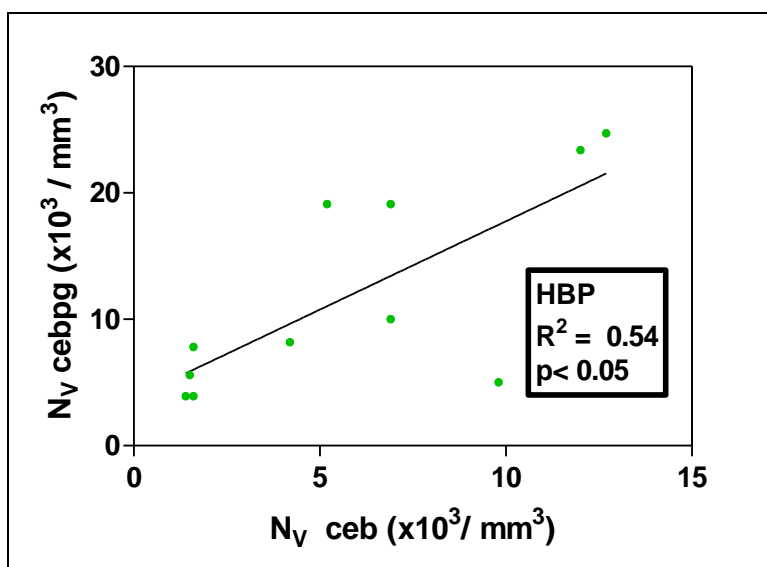
Tras el análisis de correlación de Pearson se obtuvo una relación estadísticamente significativa entre los siguientes pares de variables:

- Densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales.
- Densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de mastocitos periglandulares.

Sólo se encontró una relación estadísticamente significativa entre las variables densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales (Fig. 50), y densidad numérica de mastocitos totales y densidad numérica de mastocitos periglandulares (Fig. 51), siendo esta correlación positiva.



**Figura 50.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales en el grupo hiperplasia.



**Figura 51.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad numérica de mastocitos totales y densidad numérica de mastocitos periglandulares en el grupo hiperplasia.

➤ **CÁNCER:**

En las tablas 13 y 14 se muestran los resultados de la correlación entre las distintas parejas de variables junto a su significación estadística.

Variables correlacionadas	R	P	Significación
$L_V \leftrightarrow LI\ PCNA$	-0.208	0.457	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ mcstrom$	-0.030	0.916	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ mcep$	0.222	0.427	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ ceb$	-0.205	0.463	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ cebpg$	-0.206	0.461	NS
$L_V \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.052	0.853	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ mcstrom$	-0.262	0.345	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ mcep$	-0.079	0.779	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.482	0.069	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.403	0.136	NS
$LI\ PCNA \leftrightarrow N_V\ ep$	0.062	0.826	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ mcep$	0.604	0.017	S
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.005	0.986	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.011	0.968	NS
$N_V\ mcstrom \leftrightarrow N_V\ ep$	0.162	0.563	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ ceb$	0.280	0.313	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.241	0.387	NS
$N_V\ mcep \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.006	0.984	NS
$N_V\ ceb \leftrightarrow N_V\ cebpg$	0.980	<0.0001	S
$N_V\ ceb \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.110	0.697	NS
$N_V\ cebpg \leftrightarrow N_V\ ep$	-0.181	0.519	NS

**Tabla 13.** Correlación de pares de variables relativas en el grupo Ca. Se indican las parejas de variables correlacionadas; el coeficiente de correlación de Pearson (R); el nivel de significación (p) y si la correlación es significativa (S) o no significativa (NS).

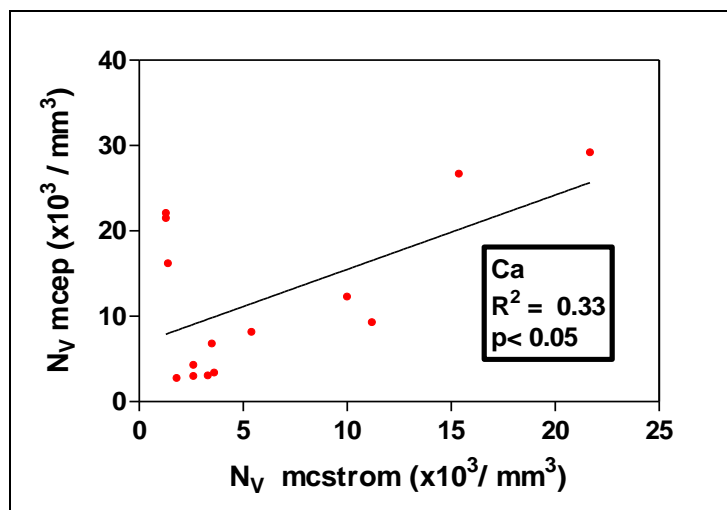
Variables correlacionadas	R	P	Significación
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow L_V$	0.173	0.552	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow \text{LI PCNA}$	-0.242	0.472	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ mcstrom}$	0.049	0.891	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ mcep}$	0.524	0.054	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ ceb}$	0.071	0.808	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ cebpg}$	0.095	0.745	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow N_V \text{ ep}$	-0.190	0.513	NS
$V_V \text{ mcstrom} \leftrightarrow V_V \text{ mcep}$	0.329	0.295	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow L_V$	0.313	0.320	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow \text{LI PCNA}$	-0.173	0.632	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ mcstrom}$	-0.237	0.537	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ mcep}$	0.415	0.179	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ ceb}$	-0.079	0.806	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ cebpg}$	-0.170	0.595	NS
$V_V \text{ mcep} \leftrightarrow N_V \text{ ep}$	0.229	0.472	NS

**Tabla 14.** Correlación de pares de variables relativas en el grupo Ca. Se indican las parejas de variables correlacionadas; el coeficiente de correlación de Pearson (R); el nivel de significación (p) y si la correlación es significativa (S) o no significativa (NS).

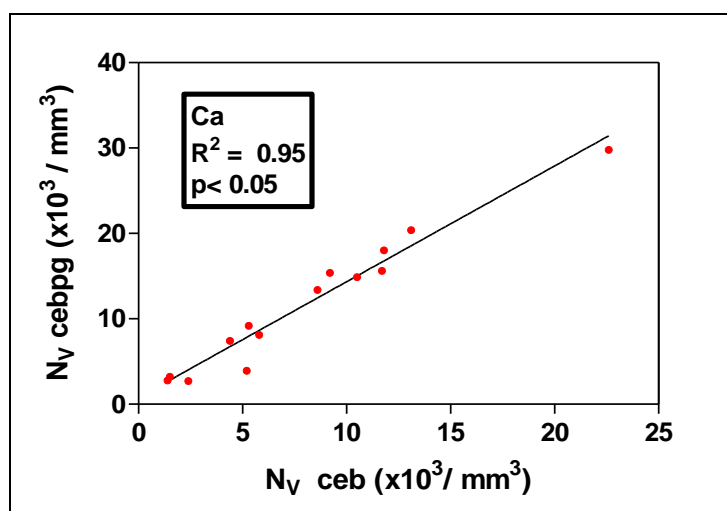
Tras el análisis de correlación de Pearson se obtuvo una relación estadísticamente significativa entre los siguientes pares de variables:

- Densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales.
- Densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de mastocitos periglandulares.

Sólo se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las variables densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales (Fig. 52), y densidad numérica de mastocitos totales y densidad numérica de mastocitos periglandulares (Fig. 53), mostrando una correlación positiva.



**Figura 52.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales en el grupo de carcinoma.



**Figura 53.** Diagrama que muestra la correlación lineal significativa entre las variables densidad numérica de mastocitos totales y densidad numérica de mastocitos periglandulares en el grupo de carcinoma.

### 3.4. Análisis de conglomerados.

Una vez determinadas las variables no correlacionadas entre sí, se realizó el análisis de conglomerados asociando cada conglomerado con un grupo de estudio en un primer paso y, posteriormente asociando cada conglomerado a benignidad o malignidad del espécimen. Se estudió la asociación entre los conglomerados y los grupos de estudio mediante el uso de tabla de contingencias y el contraste de  $\chi^2$ .

#### ➤ **CONGLOMERADOS SEGÚN GRUPOS DE ESTUDIO:**

Se realizó el análisis de conglomerados sobre la distribución de los casos en función de tres variables distintas, y determinando tres conglomerados diferentes. Posteriormente, y mediante el uso de tablas de contingencia y el contraste de  $\chi^2$ , se determinó la asociación de dichos conglomerados con los diferentes grupos de estudio (grupo control, hiperplasia y cáncer).

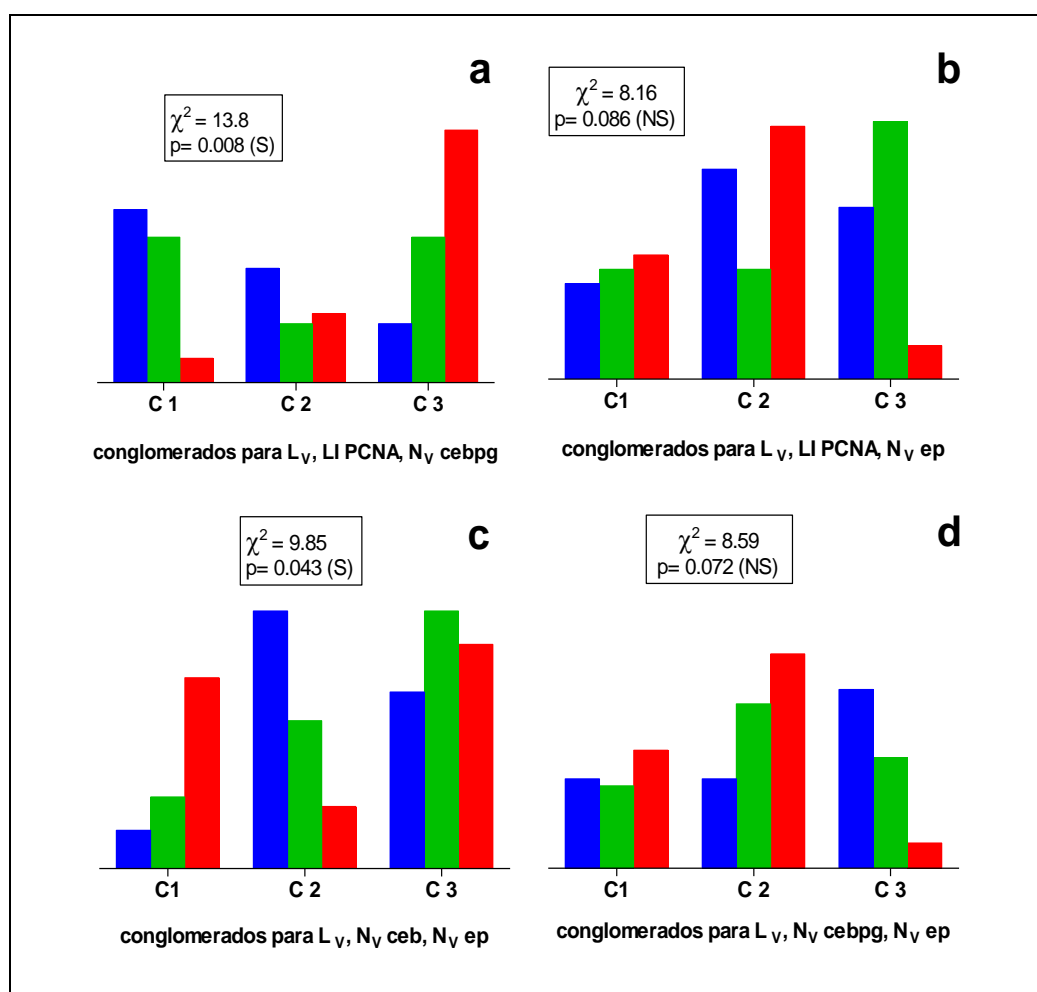
En la distribución de los casos según las variables densidad de longitud de vasos, índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de mastocitos periglandulares, la relación fue estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 54a), observándose una mayor asociación entre el conglomerado 3 y el grupo carcinoma y el conglomerado 1 y el grupo control. La distribución del grupo hiperplasia se encontró de forma más irregular en los tres conglomerados.

En la distribución de los casos según las variables densidad de longitud de vasos, índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de células epiteliales, la relación no fue estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 54b).

La distribución de los casos según las variables densidad de longitud de vasos, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 54c). Se observó una mayor asociación entre el conglomerado 2 y el grupo control, y el conglomerado 3 y el grupo hiperplasia. La distribución del grupo carcinoma fue más irregular, encontrándose una cantidad similar de casos en el conglomerado 1 y el 3.

La distribución de los casos según las variables densidad de longitud de vasos, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 54d). Se observó una mayor asociación del grupo control con el conglomerado 3, mientras que los grupos hiperplasia y carcinoma mostraban una mayor asociación con el conglomerado 2.



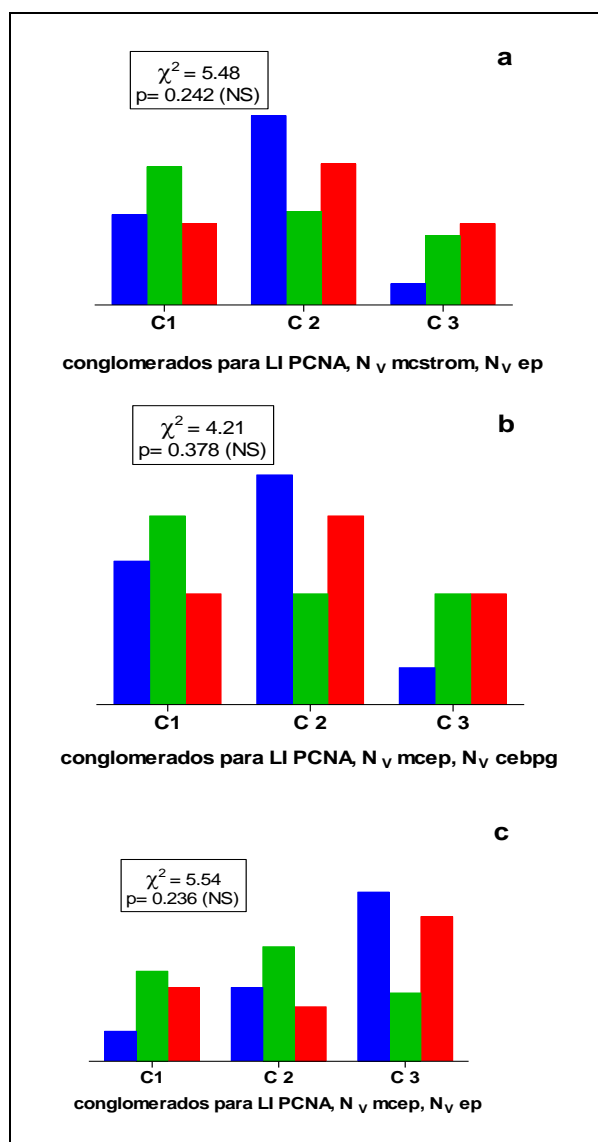


**Figura 54.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo control, verde hiperplasia y rojo carcinoma): **a)** distribución por conglomerados según las variables densidad de longitud de vasos, índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de mastocitos periglandulares; **b)** distribución por conglomerados según las variables densidad de longitud de vasos, índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de células epiteliales; **c)** distribución por conglomerados según las variables densidad de longitud de vasos, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales; **d)** distribución por conglomerados según las variables densidad de longitud de vasos, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 55a).

La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos epiteliales y densidad numérica de mastocitos periglandulares no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 55b).

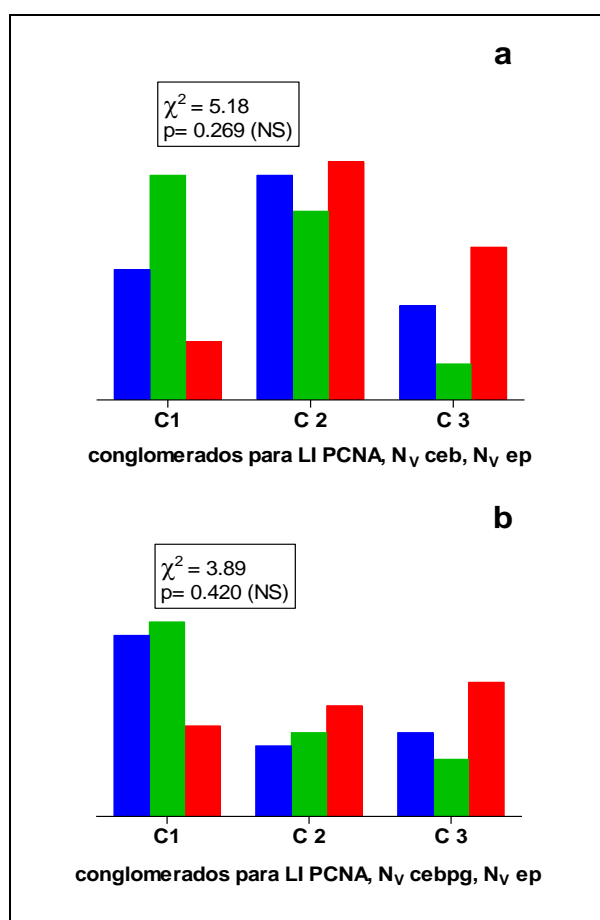
La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos epiteliales y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 55c).



**Figura 55.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo control, verde hiperplasia y rojo carcinoma): **a)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de células epiteliales; **b)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos epiteliales y densidad numérica de mastocitos periglandulares; **c)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos epiteliales y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 56a).

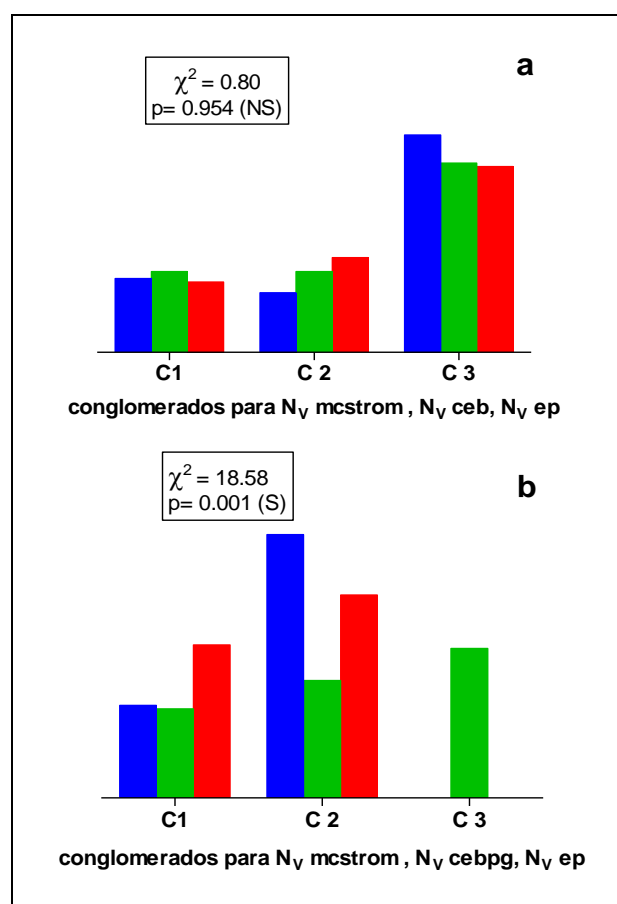
La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 56b).



**Figura 56.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo control, verde hiperplasia y rojo carcinoma): **a)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales; **b)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 57a).

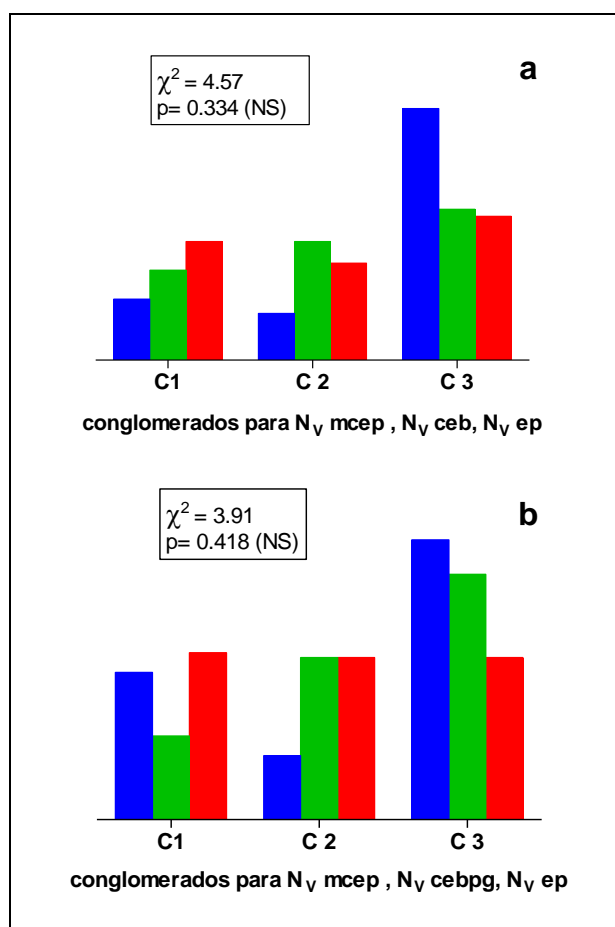
La distribución de los casos según las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 57b). Se observó una mayor asociación entre el grupo control y el conglomerado 2, y ninguna asociación entre el grupo carcinoma y el conglomerado 3. La distribución del grupo hiperplasia fue más irregular, encontrándose una distribución similar de casos en los 3 conglomerados.



**Figura 57.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo control, verde hiperplasia y rojo carcinoma): **a)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales; **b)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 58a).

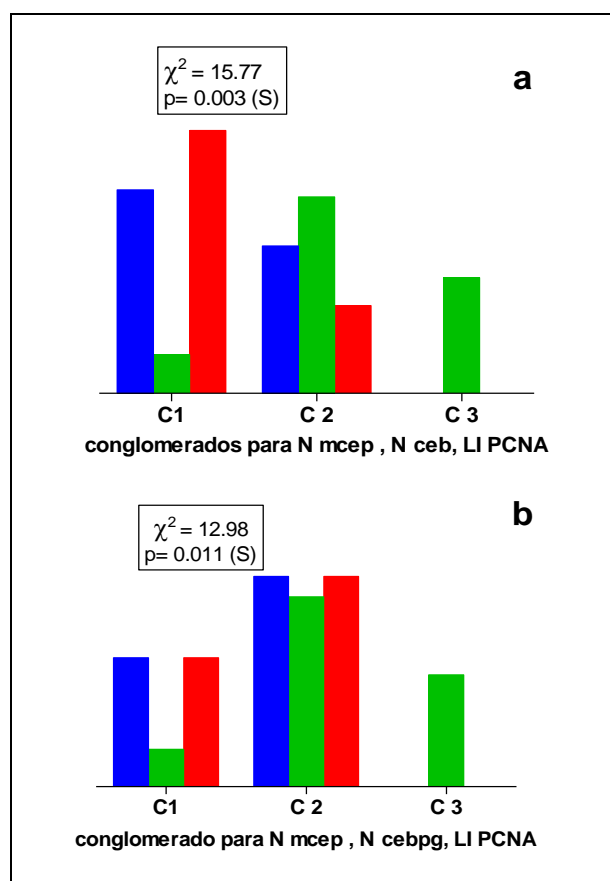
La distribución de los casos según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 58b).



**Figura 58.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo control, verde hiperplasia y rojo carcinoma): **a)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales; **b)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables número absoluto de macrófagos epiteliales, número absoluto de mastocitos e índice de marcaje de PCNA mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 59a). Se observó una mayor asociación entre el grupo carcinoma y el conglomerado 1, y ninguna asociación entre el grupo control y el grupo carcinoma y el conglomerado 3.

La distribución de los casos según las variables número absoluto de macrófagos epiteliales, número absoluto de mastocitos periglandulares e índice de marcaje de PCNA también mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio (Fig. 59b). Se observó una mayor asociación de los tres grupos de estudio (control, hiperplasia y carcinoma) y el conglomerado 2.



**Figura 59.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo control, verde hiperplasia y rojo carcinoma): **a)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos e índice de marcaje de PCNA; **b)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos periglandulares e índice de marcaje de PCNA.

➤ **CONGLOMERADOS SEGÚN BENIGNIDAD/MALIGNIDAD:**

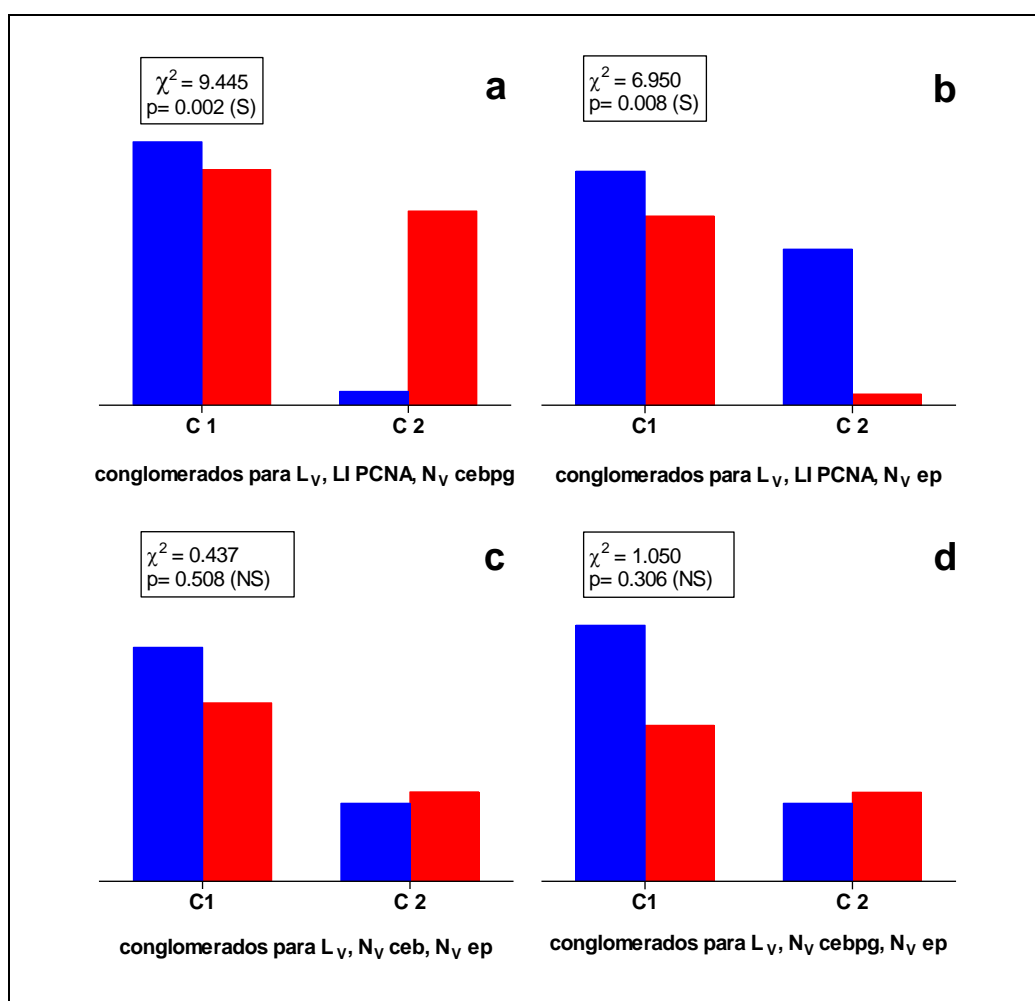
Se realizó el análisis de conglomerados sobre la distribución de los casos en función de tres variables distintas, y determinando dos conglomerados diferentes. Posteriormente, y mediante el uso de tablas de contingencia y el contraste de  $\chi^2$ , se determinó la asociación de dichos conglomerados con los grupos histopatológicos de benignidad (grupo control e hiperplasia) y de malignidad (cáncer).

La distribución de los casos según las variables densidad de longitud de vasos, índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de mastocitos periglandulares mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 60a). Se observó una mayor asociación entre el grupo benignidad y el conglomerado 1, mientras que la distribución del grupo malignidad fue más irregular.

La distribución de los casos según las variables densidad de longitud de vasos, índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de células epiteliales mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 60b). Se observó una mayor asociación entre el grupo malignidad y el conglomerado 1, mientras que la distribución del grupo benignidad fue más irregular.

La distribución de los casos según las variables densidad de longitud de vasos, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 60c).

La distribución de los casos según las variables densidad de longitud de vasos, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 60d).



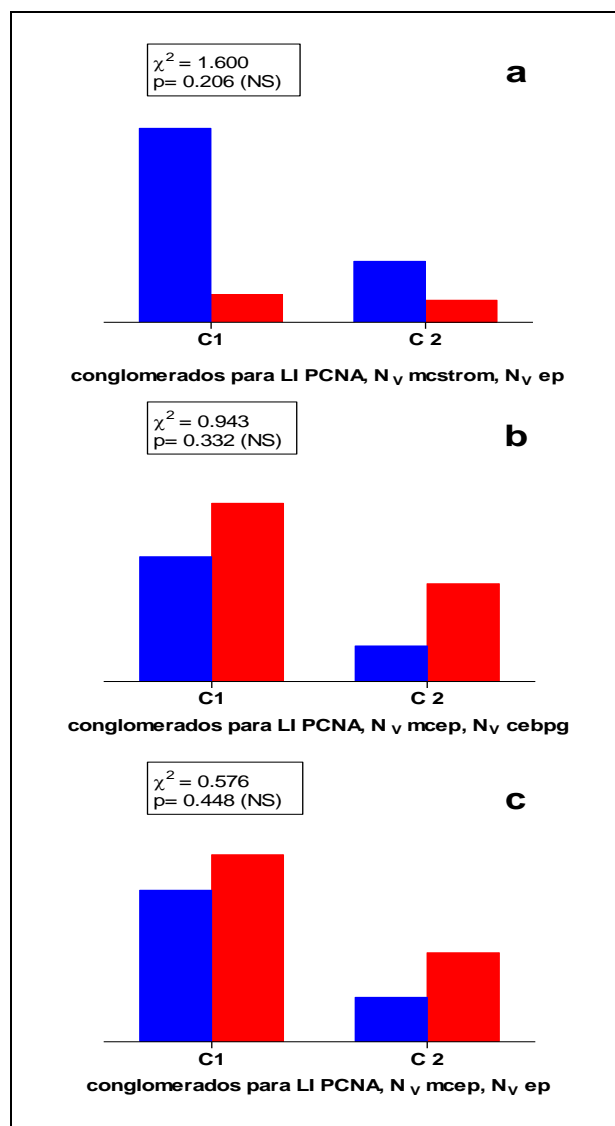
**Figura 60.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo benignidad y rojo grupo malignidad): **a)** distribución por conglomerados según las variables densidad de longitud de vasos, índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de mastocitos periglandulares; **b)** distribución por conglomerados según las variables densidad de longitud de vasos, índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de células epiteliales; **c)** distribución por conglomerados según las variables densidad de longitud de vasos, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales; **d)** distribución por conglomerados según las variables densidad de longitud de vasos, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 61a).

La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos epiteliales y densidad numérica de mastocitos periglandulares no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 61b).



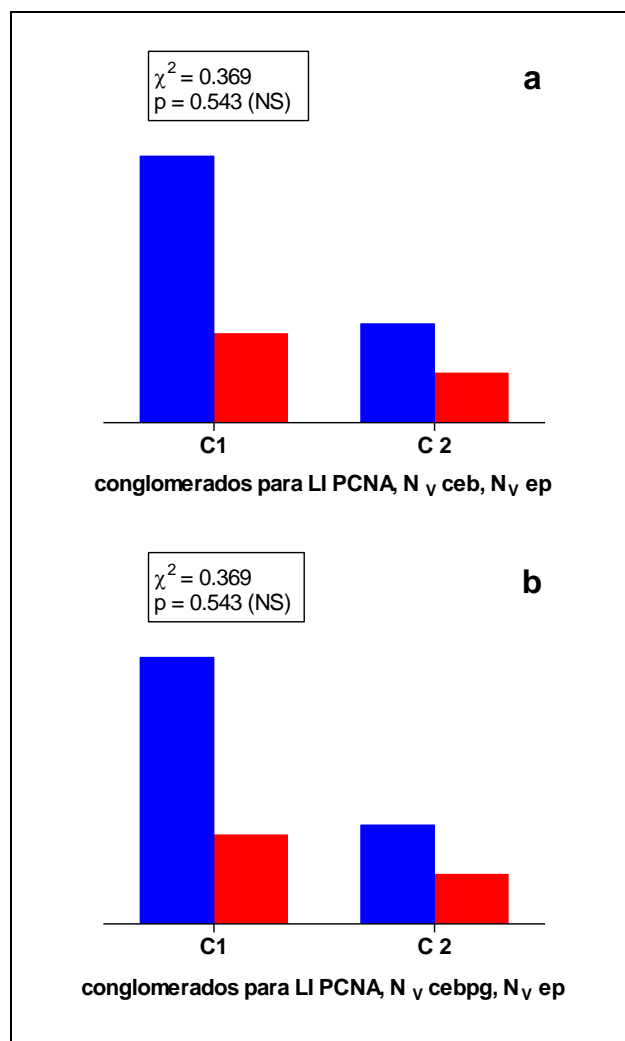
La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos epiteliales y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 61c).



**Figura 61.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo benignidad y rojo grupo malignidad): **a)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de células epiteliales; **b)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos epiteliales y densidad numérica de mastocitos periglandulares; **c)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de macrófagos epiteliales y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 62a).

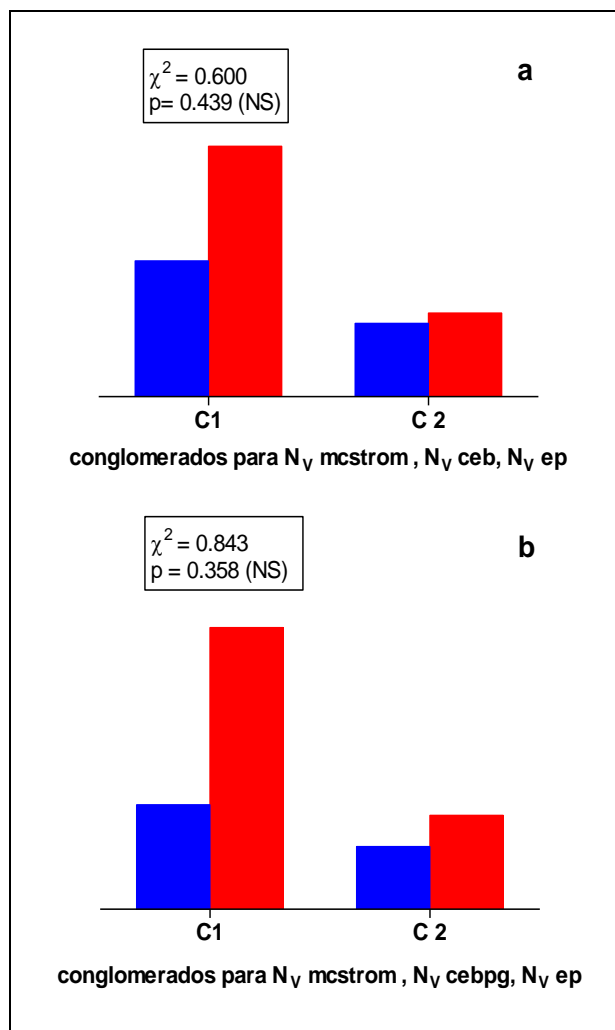
La distribución de los casos según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 62b).



**Figura 62.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo benignidad y rojo grupo malignidad): **a)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales; **b)** distribución por conglomerados según las variables índice de marcaje de PCNA, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 63a).

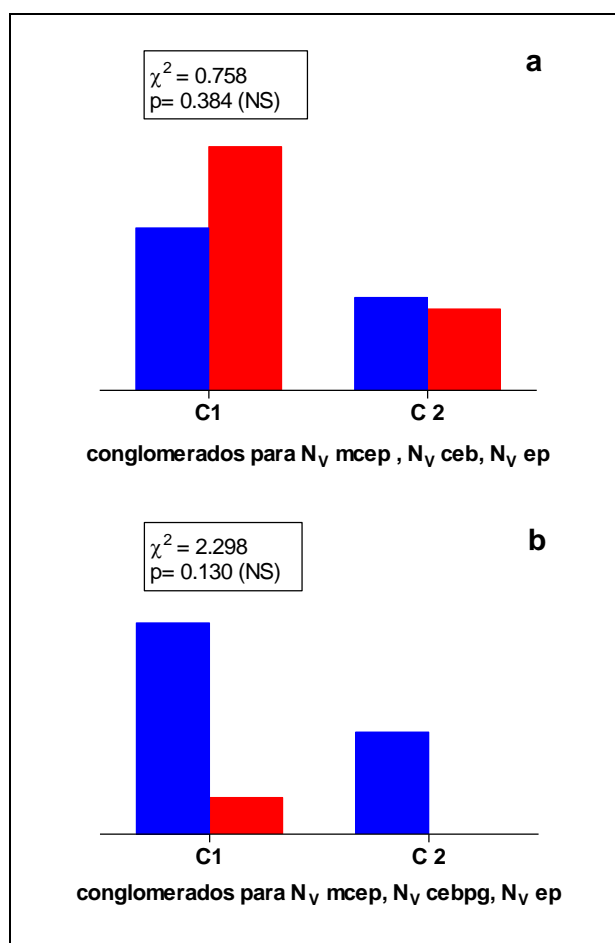
La distribución de los casos según las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 63b).



**Figura 63.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo benignidad y rojo grupo malignidad): **a)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales; **b)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos estromales, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 64a).

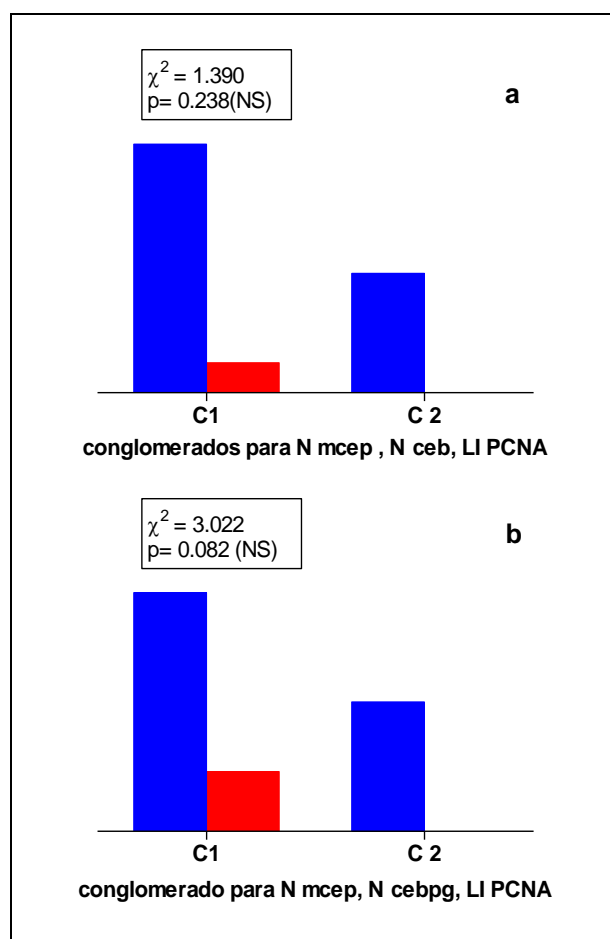
La distribución de los casos según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 64b).



**Figura 64.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo benignidad y rojo grupo malignidad): **a)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos y densidad numérica de células epiteliales; **b)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos periglandulares y densidad numérica de células epiteliales.

La distribución de los casos según las variables número absoluto de macrófagos epiteliales, número absoluto de mastocitos e índice de marcaje de PCNA no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 65a).

La distribución de los casos según las variables número absoluto de macrófagos epiteliales, número absoluto de mastocitos periglandulares e índice de marcaje de PCNA no mostró una relación estadísticamente significativa entre los conglomerados y los grupos de estudio benignidad/malignidad (Fig. 65b).



**Figura 65.** Diagramas de barras que muestran la distribución en conglomerados según distintas variables y su asociación con los diferentes grupos de estudio (código de colores: azul grupo benignidad y rojo grupo malignidad): **a)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos e índice de marcaje de PCNA; **b)** distribución por conglomerados según las variables densidad numérica de macrófagos epiteliales, densidad numérica de mastocitos periglandulares e índice de marcaje de PCNA.

## DISCUSIÓN

---

## **1. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.**

Las técnicas de cuantificación histológicas han sido profusamente utilizadas en el ámbito de la investigación con la finalidad de conocer más profundamente la estructura y composición de los tejidos en las diferentes patologías y sus posibles implicaciones en el desarrollo de las mismas. Así mismo, estas técnicas han evolucionado con el tiempo, tratando de eliminar los sesgos que el investigador introducía involuntariamente en el método de recuento, dando lugar en los últimos años al método estereológico (114). La estereología es un conjunto de métodos de carácter geométrico-estadístico que permiten obtener información cuantitativa de un determinado objeto tridimensional a partir de secciones bidimensionales del mismo (115). Las técnicas de cuantificación estereológica poseen importantes ventajas metodológicas, ya que permiten eliminar los sesgos y errores sistemáticos y son independientes del tamaño, forma y distribución del objeto de cuantificación (116), lo que las convierte en herramientas muy útiles para la determinación numérica de estructuras tridimensionales (117). Además es un método más eficiente que otras técnicas para este fin, resultando necesario un número menor de casos y secciones de los mismos para su estudio. La aplicación de estos principios a la cuantificación en el tejido prostático ha sido previamente estudiada y validada (118,119) por lo que fue el método elegido para el recuento de células en nuestro trabajo. Se aplicó el principio del disector óptico, que permite la cuantificación de

células contenidas en cuadrantes (disectores ópticos), que corresponden a áreas específicas del tejido y que se encuentran distribuidos sistemáticamente en plantillas previamente diseñadas (107). Para la fiabilidad de las estimaciones es necesario que éstas se realicen cumpliendo condiciones de aleatorización y muestreo sistemático de forma que la determinación cuantitativa sea independiente del investigador (116).

En los últimos años también se han desarrollado técnicas de análisis de imagen para determinar cuantitativamente las concentraciones tisulares o celulares de diferentes componentes (120,121). La utilización simultánea en nuestro trabajo del método estereológico junto con técnicas de análisis de imagen y programas informáticos de aleatorización como *Stereologic Software Package Cast Grid* permite un estudio riguroso mediante la aplicación de técnicas digitales que facilitan el proceso de aleatorización, muestreo sistemático y cuantificación.

## 2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS.

En la **tinción de hematoxilina-eosina** del grupo control es posible identificar glándulas acinares o tubuloacinares, con epitelio cuboidal y pseudoestratificado en la región transicional y cuboidal en las regiones periférica y central de acuerdo a lo descrito por *McNeal* (12), cuyos núcleos se disponen en el polo basal de la célula. En el grupo hipertrofia de próstata se identifica una mayor cantidad de estructuras glandulares, que crecen comprimiendo el estroma, cuya estructura se muestra alterada. Presentan menor cantidad de estructuras papilares hacia el interior de la luz glandular que en el grupo control, lo que condiciona una superficie más regular y una mayor área de luz glandular, como ya describieron *Babinski et al* (122). Las células epiteliales que componen dichas glándulas pueden ser de forma columnar, cuboidal o aplanada y con el núcleo dispuesto en el polo basal celular (13). El grupo adenocarcinoma prostático presenta una estructura histológica alterada característica del tumor prostático (14), con patrones Gleason 6 y 7 fundamentalmente (26), mostrando glándulas de tamaño variable y morfología desestructurada, con escaso estroma entre ellas, invadiendo el mismo en ocasiones en forma de grupos celulares aislados y con márgenes imprecisos. Además las células pierden su característica polaridad.

El PCNA es una proteína implicada en los mecanismos de reparación y replicación del DNA que se encuentra habitualmente en las fases G1 y G2 del ciclo celular. La **inmunotinción**



**para PCNA** ha demostrado estar relacionada con el grado tumoral y la supervivencia (123,124), y es un marcador fiable para medir la proliferación tumoral en el cáncer de próstata (125). Mediante técnicas de inmunotinción para PCNA se marcaron las células en proliferación en todos los grupos de estudio, observando un patrón homogéneo o granular de tinción, con diferentes grados de intensidad, mostrando una coloración desde el marrón oscuro en el caso de tinción homogénea, a marrón claro en el de tinción granular. Esta gradación en la tinción fue particularmente llamativa en el caso del grupo carcinoma, de acuerdo a lo ya publicado en otros estudios (126). En los casos del grupo control se observó inmunotinción predominantemente de las células epiteliales del estrato basal, y una mayor proporción de células epiteliales teñidas en la región transicional, probablemente debido al superior recambio producido por la mayor exposición a la orina. En el grupo hiperplasia fue posible observar una llamativa proliferación de las estructuras glandulares prostáticas, pero manteniéndose una proporción y distribución de células epiteliales inmunorreactivas para PCNA similar a la encontrada en el grupo control. En cambio, en el grupo de cáncer se identificó una mayor proporción de células epiteliales inmunoteñidas y una distribución irregular de las mismas, formando parte de acinos o distribuidas en el estroma tumoral como glándulas abortivas o células sueltas, de acuerdo a las características de proliferación propias del cáncer de próstata ya descritas por otros autores (126).

El factor de Von Willebrand es una glucoproteína plasmática producida por las células endoteliales que sirve como portador y estabilizador del Factor VIII de la coagulación. Estas características lo convierten en una diana apropiada para la identificación de estructuras vasculares en muestras tisulares mediante técnicas de **inmunohistoquímica para Factor VIII** (127), por lo que en nuestro trabajo se utilizó como reactivo para marcar las estructuras vasculares en los tres grupos de estudio. En el grupo control se observaron microvasos marcados en todas las regiones, no pudiendo identificarse mayor densidad de ellos en ninguna de las zonas. Su distribución era predominantemente en torno a los acinos prostáticos y en contacto directo con los mismos, aunque también fue posible encontrarlos en el estroma periglandular en menor proporción. En el grupo de hipertrofia prostática, se observó aproximadamente la misma proporción de microvasos, aunque estos se concentraban principalmente en la región transicional de la próstata, con una distribución similar a la de los controles, identificando estos vasos mayoritariamente en contacto con el epitelio de los acinos prostáticos, coincidiendo con lo ya publicado por otros autores (128). En cambio, en el grupo con cáncer, se observaba una mayor densidad de longitud de vasos, con una distribución más irregular y mayor cantidad de vasos en el estroma periglandular. *Bigler et al* (129) ya describían

estas diferencias de distribución de microvasos entre la patología benigna y maligna prostática, observando una mayor densidad de capilares en el carcinoma prostático con una ratio de aproximadamente el doble y con una distribución más aleatoria. *Santamaría et al* (111) estudiaron el patrón de distribución de los microvasos en próstata controles, hipertróficas y con cáncer, mediante técnicas de análisis de secuencias simbólicas, concluyendo que había patrones de microvasos característicos para cada uno de los grupos.

El MAC-387 es un anticuerpo monoclonal utilizado como marcador para células de estirpe histiocítica (monocitos, granulocitos y macrófagos tisulares), que reconoce un antígeno intracitoplasmático llamado calprotectina, miembro de la familia de la proteína S100 (130). Mediante técnicas **inmunohistoquímicas para MAC-387** se realizó marcaje de las células macrofágicas en los diferentes grupos de estudio, y se observó su distribución en las diferentes regiones de la próstata normal, en la hipertrofia de próstata y el adenocarcinoma. Además se realizó una distinción entre los macrófagos que se encontraban en el compartimento estromal y en el epitelial en los distintos grupos. Así, fue posible identificar la presencia de macrófagos en ambos compartimentos en todos los grupos de estudio, de un tamaño y forma variable. En el grupo control se observó una mayor proporción de macrófagos en el compartimento epitelial de la región transicional, mientras que en la región central la proporción fue mayor en el compartimento estromal. En la región periférica las proporciones fueron similares. En la hipertrofia prostática se identificó una mayor proporción de macrófagos en el compartimento estromal al compararlo con la región transicional de las próstatas controles, mientras que en el adenocarcinoma había una mayor proporción de macrófagos en el compartimento epitelial que en la región periférica del grupo control. Como ya describieran *Lissbrant et al* (97) y *Fujii et al* (96), se confirma una mayor presencia de macrófagos intratumorales en la patología maligna, mientras que en los controles y la patología benigna los macrófagos se distribuyen mayoritariamente en el compartimento estromal, hallazgo que apoya la idea de que la presencia de macrófagos intratumorales podrían favorecer el desarrollo del propio tumor.

El CD117 es una proteína transmembrana de la familia de tirosín-quinasa del receptor de clase III presente en los mastocitos, cuyo ligando natural es el factor de crecimiento de mastocitos. El anticuerpo C-KIT o antiCD117 es un anticuerpo con afinidad por el receptor del factor de crecimiento de mastocitos (CD117), y que por lo tanto permite marcar este tipo de células (131). Se realizó **inmunotinción para C-KIT** en los diferentes grupos de estudio, y se observó la presencia y distribución de mastocitos tanto en el compartimento estromal como en el peritumoral. En el grupo control se identificaron mastocitos en todas las regiones, y fue posible encontrarlos en el compartimento estromal, el periglandular, el glandular e incluso en

la luz de las glándulas. Al observar cada una de las regiones por separado, fue posible apreciar una mayor proporción de mastocitos periglandulares en la región transicional, y una menor proporción en la región periférica. En los grupos hipertrofia prostática y adenocarcinoma de próstata también se determinó la presencia de mastocitos en todos los compartimentos, no siendo posible establecer diferencias en cuanto a su distribución con respecto a las regiones transicional y periférica del grupo control. *Aydin et al* (4) al estudiar la distribución de mastocitos en el adenocarcinoma prostático y en la hiperplasia benigna, encontraron una mayor proporción de mastocitos en la región peritumoral que en la intratumoral en las muestras de cáncer, aunque concluían que esto podía ser debido a una mayor degranulación de los mismos en la zona intratumoral, y por ello, un menor marcaje inmunohistoquímico de los mismos. Al comparar la distribución en carcinoma prostático e hiperplasia, también observaron una mayor proporción de mastocitos en la hiperplasia con respecto a la región intratumoral, no encontrando diferencias en cambio al compararlo con la región peritumoral.

### 3. ESTUDIO CUANTITATIVO.

En el análisis de la varianza de las variables número absoluto de células epiteliales, macrófagos y mastocitos así como la longitud absoluta de microvasos se encontró que al comparar las regiones del grupo control había un incremento en términos absolutos de todos estos parámetros en la región periférica con respecto a la región transicional y la región central. Este hecho probablemente tenga un significado limitado al ponerlo en relación con el volumen que ocupan cada una de las regiones en las próstata en ausencia de patología. De acuerdo a lo descrito por *McNeal* (132) en sus estudios de anatomía regional de la próstata, la región periférica ocupa un 70% de la misma, mientras que las regiones central y transicional tan solo se distribuyen en un 25% y 5 % respectivamente. Así, al tener un considerable mayor volumen la región periférica, resulta lógico que también lo sea el número absoluto de células que se encuentran en ella.

Al comparar las medias de estas variables en los diferentes grupos de estudio (control, hiperplasia y cáncer), nos encontramos una situación similar. Todas las variables absolutas se encuentran aumentadas en el grupo hiperplasia con respecto a los grupos control y cáncer. Si tenemos en cuenta que la hiperplasia benigna de próstata es una patología caracterizada por el aumento de volumen de la glándula prostática (17), que puede llegar a sobrepasar los 100

cc, resulta coherente que también esté aumentado el número absoluto de células que la componen con respecto a los otros dos grupos de estudio.

Debido a estas características volumétricas, y la importante diferencia entre los grupos, consideramos que los parámetros absolutos no son adecuados para establecer comparaciones. Es por eso que también se analiza la variable densidad numérica, que pone el número absoluto en relación con el volumen del espacio de referencia, salvando así las diferencias en cuanto a volumen de distribución.

Al comparar la variable densidad numérica de células epiteliales, no fue posible encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes regiones del grupo control o los diferentes grupos de estudio. En cambio, al comparar la variable índice de marcaje de PCNA de células epiteliales, aunque no es posible encontrar diferencias entre las regiones del grupo control, sí que se establece una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio, objetivándose un mayor índice de marcaje de PCNA en el cáncer que en el grupo control o la hiperplasia. Estos hallazgos permiten confirmar el hecho de que la histología tumoral en el cáncer de próstata no se caracteriza por una mayor densidad numérica de células epiteliales, sino por una mayor proporción de células epiteliales en fase de proliferación con respecto a las que se encuentran en fase de reposo, lo que llamamos un mayor índice de proliferación, como ya describieron *Meyer et al* en sus estudios (133).

La cuantificación de densidad de longitud de microvasos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las distintas regiones del grupo control, pero sí entre los diferentes grupos de estudio, observándose una mayor densidad de longitud de microvasos en el grupo hiperplasia y cáncer con respecto al grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Como ya describíamos en la introducción, la formación de neovasos es una de las condiciones fundamentales para el mantenimiento en el tiempo de los procesos de inflamación crónica y crecimiento tumoral, permitiendo de este modo la proliferación celular y la llegada de factores necesarios para la misma (82,101,129).

El papel de las células inflamatorias en el mantenimiento a largo plazo de los procesos de inflamación crónica o crecimiento tumoral es actualmente objeto de estudio por su posible implicación pronóstica y el desarrollo de terapias inmunoestimuladoras o inmunosupresoras como tratamiento de los mismos (73,76,96,95).

Al cuantificar la presencia de macrófagos en los diferentes grupos de estudio, se determinaron los macrófagos epiteliales y estromales por separado, con la finalidad de

establecer sus distintas implicaciones en el papel promotor o supresor tumoral como se describe en los trabajos publicados por *Fujii* (96), *Halin* (95) y *Lissbrant* (97) y colaboradores.

Al analizar la variable densidad numérica de macrófagos epiteliales y estromales en las distintas regiones del grupo control, se observaron diferencias estadísticamente significativas, encontrando una mayor densidad numérica media de macrófagos estromales en la región transicional y menor en la región central, siendo inversa la distribución de macrófagos epiteliales, con una mayor densidad numérica media de macrófagos epiteliales en la región central y una menor densidad en la región transicional. No fue posible encontrar diferencias en la región periférica. Este hecho podría tener relación con la mayor predisposición de la región periférica al desarrollo de tumores, y que la presencia de macrófagos epiteliales que se observa en la región central, corresponda a macrófagos polarizados y diferenciados hacia el subtipo M1, con mayor capacidad tumoricida y de eliminación de microorganismos (58). La ausencia de este tipo de macrófagos en el compartimento epitelial de la región periférica podría facilitar la aparición de tumores en dicha región.

En cuanto a las diferencias con respecto a la variable densidad numérica de macrófagos epiteliales y estromales en los diferentes grupos de estudio (control, hiperplasia y cáncer), también se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Mientras que en el grupo hiperplasia fue posible determinar una mayor densidad numérica media de macrófagos estromales, en el grupo cáncer lo hacía una mayor densidad numérica media de macrófagos epiteliales. Los resultados en el grupo hiperplasia de próstata con mayor densidad numérica media de macrófagos estromales coinciden con los que se encontraron en la región transicional del grupo control, región en la que se desarrolla esta patología. Al contrario, mientras que en la región periférica no fue posible encontrar diferencias significativas en cuanto a la distribución de macrófagos epiteliales o estromales, sí que se encontró dicha diferencia en el cáncer, con una mayor densidad numérica media de macrófagos epiteliales, hallazgo que sugiere que la presencia de estos macrófagos en el seno tumoral podría colaborar en el desarrollo tumoral y que se corresponde con lo descrito por los grupos de *Halin* (95), *Fujii* (96) y *Lissbrant* (97). Es probable que estos macrófagos hayan migrado hasta el compartimento epitelial estimulados por las citoquinas producidas por las células tumorales y por tanto estén polarizados hacia el subtipo M2, con menor capacidad tumoricida, y mayor capacidad para estimular la proliferación y la angiogénesis (61,96).

*Lissbrant* (97) también estudió las diferencias en cuanto a volumen celular de los macrófagos en el tumor de próstata y sus posibles implicaciones pronósticas. En nuestro

estudio, determinamos las variables fracción de volumen y volumen celular promedio de macrófagos estromales y epiteliales. Mientras que no fue posible encontrar diferencias en la comparación de medias de la variable volumen celular promedio de macrófagos epiteliales y estromales entre los grupos control, hiperplasia y cáncer, sí que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la variable fracción de volumen de macrófagos estromales. Fue posible objetivar una mayor fracción de volumen media de macrófagos estromales en el grupo cáncer con respecto a los grupos control e hiperplasia. En cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de la fracción de volumen media de macrófagos epiteliales. Esto viene a complementar los resultados publicados por *Lissbrant* (97), estableciendo que la presencia de macrófagos de mayor volumen en el tejido tumoral probablemente sea fundamentalmente a costa de los macrófagos estromales, y no de los epiteliales o periglandulares. Además, se realizó una comparación de medias de las variables fracción de volumen y volumen celular promedio entre los grupos de estudio por compartimentos, encontrando una diferencia estadísticamente significativa en el caso de la fracción de volumen media por compartimentos en el grupo control y en el cáncer, y en el volumen celular promedio por compartimentos en el grupo hiperplasia, lo que viene a confirmar los resultados anteriormente descritos.

También se determinó la presencia y distribución de mastocitos en dos compartimentos diferentes, el estromal y periglandular, determinando las variables mastocitos totales y periglandulares con el fin de objetivar si al igual que con los macrófagos, existían diferencias entre ellos. Al estudiar la densidad numérica de mastocitos periglandulares si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de medias entre las distintas regiones del grupo control, identificándose una mayor densidad numérica media en la región transicional y una menor densidad en la región periférica. Sin embargo, no fue posible establecer diferencias entre los diferentes grupos objeto de estudio (control, hiperplasia y cáncer). Aunque *Aydin* (87) y *Johansson* (98) y *colaboradores*, describen en sus respectivos trabajos que en las regiones intratumorales es posible encontrar una menor cantidad de mastocitos, *Fleischman* (76) reflejó como la cantidad de mastocitos se asociaba con el grado de Gleason tumoral y por tanto con la agresividad de los mismos. Teniendo en cuenta esto, y la baja agresividad de los tumores de nuestra muestra (Gleason 6 (3+3) 27%, Gleason 7 (3+4) 53% y Gleason 7 (4+3) 20%), podría ser que estas características representen un sesgo que determine que no se encuentren diferencias en la cantidad de mastocitos intratumorales en el grupo cáncer con respecto a los grupos hiperplasia y control. Por lo tanto, sería necesario

evaluar muestras con una distribución similar de los diferentes valores posibles de grados de Gleason para poder extraer conclusiones más ajustadas a la realidad.

#### **4. ESTUDIO DE CORRELACIÓN.**

Al analizar las diferentes variables en el grupo control, fue posible encontrar una relación estadísticamente significativa entre varias de ellas. Así, encontramos una correlación positiva entre la densidad de longitud de microvasos y el índice de marcaje de PCNA, la densidad de longitud de microvasos y la densidad numérica de macrófagos estromales, el índice de marcaje de PCNA y la densidad numérica de macrófagos estromales, la densidad numérica de macrófagos estromales y la densidad numérica de macrófagos epiteliales, la densidad numérica de mastocitos totales y la densidad numérica de mastocitos periglandulares, y la fracción de volumen de macrófagos epiteliales y la fracción de volumen de macrófagos estromales. Estos hallazgos reflejan la relación directa entre la presencia de células inflamatorias, ya sean mastocitos o macrófagos, y los procesos de proliferación y angiogénesis, independientemente de la localización compartimental de dichas células inflamatorias (estromal o epitelial) en las próstatas normales. Así mismo, la correlación positiva entre la fracción de volumen de macrófagos estromales y la de macrófagos epiteliales, muestra que en las próstatas normales el aumento de volumen de macrófagos no expresa predilección por el compartimento estromal o epitelial. Al contrario, se observó una correlación negativa entre las variables fracción de volumen de macrófagos estromales y densidad numérica de mastocitos totales, y la variable fracción de volumen de macrófagos epiteliales y densidad numérica de mastocitos totales, lo que sugiere que el aumento de volumen de macrófagos en cualquiera de los dos compartimentos, va asociado a una disminución en la cantidad relativa de mastocitos totales.

Una vez conocidas las relaciones entre las variables, resulta interesante comprobar si esas relaciones se mantienen o no en la patología prostática benigna o maligna.

Para ello, se realizó el mismo estudio de correlación y regresión lineal en el grupo de hiperplasia, siendo posible sólo encontrar una relación estadísticamente significativa entre las variables densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos

epiteliales y las variables densidad numérica de mastocitos totales y densidad numérica de mastocitos periglandulares. La correlación hallada fue positiva en ambos casos.

Al estudiar la correlación de dichas variables en el grupo cáncer, también fue posible encontrar únicamente dicha correlación entre las variables densidad numérica de macrófagos estromales y densidad numérica de macrófagos epiteliales y las variables densidad numérica de mastocitos totales y densidad numérica de mastocitos periglandulares.

En ambos casos, grupo hiperplasia y cáncer, la relación entre las variables mastocitos totales y mastocitos periglandulares no es representativa, ya que son variables relacionadas previamente porque el número de mastocitos totales incluye el número de mastocitos periglandulares.

Nuestros resultados no confirman lo ya descrito por otros autores como *Johansson et al* (98) que encontró una correlación negativa entre la cantidad de mastocitos intratumorales y la presencia de angiogénesis y proliferación, y positiva entre la cantidad de mastocitos peritumorales y la proliferación, o lo descrito por *Halin et al* (95) y *Lissbrant et al* (97) que describían una correlación positiva entre la cantidad de macrófagos extratumorales, la proliferación, la angiogénesis o el área celular de macrófagos, pero nos permiten extraer algunas conclusiones. Los hallazgos de nuestro estudio reflejan la pérdida de las relaciones descritas en el grupo control en presencia de patología benigna (hiperplasia) o maligna (cáncer), lo que puede traducirse en una alteración de las relaciones entre los mecanismos fisiológicos en los procesos patológicos, de forma que la relación entre dichos mecanismos no parece ajustarse a las condiciones propias del tejido prostático normal.

Además, podemos fijarnos en las variables que muestran una correlación muy cercana a la significación estadística, y que podríamos conseguir aumentar mejorando la potencia estadística del estudio tratando de disminuir el error de tipo II, modificando factores como el tamaño muestral o la magnitud del efecto a detectar. Dichas variables cercanas a la significación estadística en cuanto al análisis de correlación son la densidad de longitud de microvasos y el índice de marcaje de PCNA y la densidad numérica de macrófagos estromales y la densidad numérica de mastocitos totales en el caso del grupo hiperplasia, y el índice de marcaje de PCNA y densidad numérica de mastocitos totales y la fracción de volumen de macrófagos estromales y la densidad numérica de macrófagos epiteliales en el grupo cáncer.



## 5. ESTUDIO DE CONGLOMERADOS.

Por último, y con la finalidad de encontrar una posible relación entre los distintos grupos de variables y los grupos de estudio se realizó un estudio de conglomerados.

### 5.1. Según grupos de estudio (control, hiperplasia y cáncer).

En un primer paso se agruparon los casos en función de tres variables diferentes, y se determinaron 3 conglomerados distintos de casos en función de las mismas, estudiando posteriormente la relación entre dichos conglomerados y los grupos de estudio.

En el caso de las variables relativas, se manifiesta que existen tres tríos ( $L_v$ , LIPCNA,  $N_v$  cebpg); ( $L_v$ ,  $N_v$  ceb,  $N_v$  ep) y ( $N_v$  mcstrom,  $N_v$  cebpg,  $N_v$  ep) que son capaces de agrupar significativamente a los casos en tres conglomerados distintos, por tanto se puede decir que esos tres tríos discriminan los casos en controles, hiperplasia y cáncer: la densidad de longitud vascular, la proliferación epitelial, la densidad numérica de mastocitos y macrófagos estromales y la densidad numérica de células epiteliales son variables que, combinadas en triadas no correladas aportan información sobre el tipo de patología (HBP, cáncer) existente.

Podemos concluir por tanto, que dichas combinaciones de variables, y por tanto la relación que existe entre ellas, son las que mejor describen las características de cada uno de los grupos de estudio. En el caso del cáncer de próstata, la relación entre dichas variables fue puesta de manifiesto mediante un modelo murino de cáncer de próstata estudiado por *Halin et al* (95), que evidenciaba la asociación entre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y los macrófagos extratumorales. Además, constataron una mayor regulación de la proliferación y la angiogénesis en el modelo murino al compararlo con los experimentos in vitro, por lo que sugerían un origen macrofágico de los factores que estimulaban dichos procesos.

Para las variables absolutas el interés de la discriminación es menor, ya que el gran volumen ocupado por el adenoma prostático sesga la información. Así observamos cómo para los dos tríos de variables absolutas que agrupan significativamente a los casos ( $N$  mcep,  $N$  ceb, LIPCNA) y ( $N$  mcep,  $N$  cebpg, LIPCNA), constituyen un conglomerado que contiene únicamente casos de hiperplasia.

## 5.2. Según benignidad/malignidad.

Posteriormente, una vez agrupados los casos en función de tres variables diferentes, se determinaron dos conglomerados distintos, y se buscó la relación entre los conglomerados y los grupos benignidad (control e hiperplasia) y malignidad (cáncer).

En el caso de las variables relativas, se manifiesta que existen dos tríos ( $L_v$ , LIPCNA,  $N_v$  cebpg) y ( $L_v$ , LIPCNA,  $N_v$  ep) que son capaces de agrupar significativamente a los casos en dos conglomerados distintos, por tanto se puede decir que esos dos tríos discriminan los casos en entidades benignas (controles y HBP) y malignas (cáncer): la densidad de longitud vascular, la proliferación epitelial y la densidad numérica de células epiteliales son variables que, combinadas en triadas no correladas aportan información sobre la naturaleza benigna o maligna de los casos. Es interesante destacar que las variables referentes a la cantidad relativa de macrófagos y mastocitos permiten afinar en la discriminación en patologías concretas (HBP y Ca), mientras que las que se refieren a cambios en el tamaño de la población epitelial y de los vasos sólo separan los casos en benignos o malignos.

## CONCLUSIONES

---

- 1) La determinación de número absoluto de células epiteliales, macrófagos, mastocitos y longitud absoluta de microvasos y comparación de medias entre las diferentes regiones del grupo control y los diferentes grupos de estudio (control, hiperplasia y cáncer) se encuentra sesgado por las importantes diferencias de volumen de distribución de dichas células en los distintos grupos. Por tanto, resulta más adecuado el análisis de variables que tengan en cuenta el volumen de distribución de las mismas, en nuestro caso la densidad numérica y densidad de longitud.
- 2) La presencia de un mayor índice de marcaje de PCNA en el grupo cáncer con respecto a los grupos hiperplasia y control corrobora el hecho de que en los tumores las células escapan a los mecanismos de control de proliferación y apoptosis.
- 3) La determinación de una mayor densidad de longitud de vasos en los grupos hiperplasia y cáncer refleja el importante papel de la angiogénesis en el mantenimiento de los procesos de inflamación crónica y proliferación tumoral.
- 4) La ausencia de diferencias en cuanto a la determinación de densidad numérica de macrófagos estromales y epiteliales en la región periférica del grupo control podría tener relación con la mayor predisposición de esta región a la aparición de tumores, reflejando la ausencia de los macrófagos que si se encuentran presentes en el compartimento epitelial de la región central, y que podrían corresponder a macrófagos tipo M1, con capacidad tumoricida.
- 5) La mayor densidad numérica de macrófagos estromales objetivada en el grupo hiperplasia podría favorecer el desarrollo de la inflamación crónica, mientras que la mayor densidad numérica de macrófagos epiteliales en el grupo cáncer podría hacerlo con el desarrollo tumoral, debido a la migración y diferenciación de macrófagos tipo M2 estimulada por las propias células tumorales.
- 6) Mientras que fue posible determinar una mayor densidad numérica de mastocitos periglandulares en la región transicional y una menor densidad numérica en la región periférica, no fue posible encontrar diferencias en la región central, hallazgo que podría estar en relación con la aparente resistencia de esta región a la aparición de dichas patologías.

- 7) Se objetivó una mayor fracción de volumen de macrófagos estromales en el grupo cáncer, determinando que la diferencia entre compartimentos en dicho grupo fue estadísticamente significativa, por lo que aunque la densidad numérica de macrófagos estromales no se encuentra aumentada, si lo hace el volumen que ocupan estos macrófagos, siendo de mayor tamaño.
- 8) En el estudio de correlación de variables en los diferentes grupos de estudio sólo fue posible encontrar dicha asociación entre distintas variables en el grupo control, mientras que en los grupos hiperplasia y cáncer sólo se encontró una correlación directa entre la densidad numérica de macrófagos estromales y macrófagos epiteliales. Dichos hallazgos no nos permiten confirmar ni rechazar la relación descrita por otros autores entre variables como proliferación, angiogénesis, macrófagos y mastocitos.
- 9) El estudio de conglomerados permite establecer la posible relación entre la angiogénesis, la proliferación celular, la cantidad de células epiteliales, los mastocitos periglandulares, los mastocitos totales y los macrófagos epiteliales en los distintos grupos de estudio lo que parece confirmar la implicación de macrófagos epiteliales y mastocitos periglandulares en los procesos de angiogénesis y proliferación celular.

# RESUMEN

---

La patología prostática tanto benigna como maligna, posee una importante prevalencia e incidencia en nuestro medio, representando unas de las principales causas de consulta en urología. Los recursos empleados para el diagnóstico y tratamiento de ambas enfermedades son enormes y presentan un ascenso paulatino. Es por ello que el estudio de estas patologías continúa activo tanto en el ámbito clínico como en el de investigación básica, con el fin de reconocer sus patrones fisiopatológicos y la repercusión clínica en los pacientes.

Ambas patologías están caracterizadas por la alteración de los mecanismos fisiológicos de proliferación y angiogénesis y el infiltrado del tejido prostático por células inflamatorias parece colaborar en este aspecto. Algunos estudios han pretendido evaluar el papel de las células inflamatorias en la progresión y mantenimiento de estas enfermedades, buscando un nuevo objetivo para su tratamiento. En concreto, en el adenocarcinoma prostático, numerosos trabajos tratan de valorar y cuantificar la presencia y distribución de macrófagos y células cebadas, así como su repercusión sobre el pronóstico clínico. Estos estudios pretenden como último objetivo la obtención de una herramienta más que permita estratificar los pacientes de acuerdo a su pronóstico, y poder realizar un tratamiento ajustado según la agresividad tumoral, y la de poder explorar nuevas vías de tratamiento aparte de las conocidas.

El propósito de este trabajo es estudiar de forma cuantitativa la presencia y distribución de macrófagos y células cebadas en próstatas normales y patológicas, así como su relación con los procesos de angiogénesis y proliferación celular, propios de estas patologías.

Para ello se han estudiado un total de 40 próstatas, distribuidas en 3 grupos según la presencia o no de patología. 10 correspondían a controles obtenidos de varones donantes de órganos y sin patología conocida, 15 a pacientes con hiperplasia benigna de próstata sometidos a tratamiento quirúrgico mediante adenomectomía prostática y las 15 últimas a pacientes sometidos a prostatectomía radical como tratamiento quirúrgico de un adenocarcinoma prostático diagnosticado previamente mediante biopsia.

Se procedió a la determinación del volumen de la pieza previamente al estudio histológico, salvo en las piezas de adenocarcinoma, donde sólo se determinó el volumen tumoral. Los cortes histológicos se fijaron en paraformaldehído al 10% y se incluyeron en parafina para su tallado. Se procedió a su tinción de rutina con hematoxilina-eosina, y a la inmunotinción para PCNA (antígeno de proliferación celular), factor VIII, MAC387 y C-KIT, con el fin de detectar células en fase de proliferación celular, microvasos, macrófagos y mastocitos o células cebadas respectivamente.

Una vez realizada la inmunotinción se realizaron las siguientes determinaciones cuantitativas:

- Densidad de longitud y longitud absoluta de microvasos sanguíneos inmunoteñidos para Factor VIII.
- Densidad numérica y número absoluto de macrófagos estromales inmunoteñidos para MAC 387.
- Densidad numérica y número absoluto de macrófagos intraepiteliales inmunoteñidos para MAC 387.
- Densidad numérica y número absoluto de mastocitos totales inmunoteñidos para C-Kit.
- Densidad numérica y número absoluto de mastocitos periglandulares inmunoteñidos para C-Kit.
- Densidad numérica y número absoluto de células epiteliales.
- Índice de marcaje de PCNA del epitelio.
- Fracción de volumen del estroma y del epitelio ocupada por macrófagos inmunoteñidos para MAC 387.
- Volumen promedio del citoplasma de macrófagos estromales e intraepiteliales inmunoteñidos para MAC 387.

En el grupo control se estudiaron dichos parámetros en cada una de las regiones de la próstata descritas por McNeal.

El análisis de los datos obtenidos llevó a las siguientes conclusiones:

- La determinación de variables absolutas y comparación de medias entre las diferentes regiones del grupo control y los diferentes grupos de estudio (control, hiperplasia y cáncer) se encuentra sesgado por las importantes diferencias de volumen de distribución de dichas células en los distintos grupos, por lo que resulta más adecuado la utilización de variables relativas que tengan en cuenta el volumen de distribución.



- La ausencia de diferencias en cuanto a la determinación de densidad numérica de macrófagos estromales y epiteliales en la región periférica del grupo control podría tener relación con la mayor predisposición de esta región a la aparición de tumores, reflejando la ausencia de los macrófagos que sí se encuentran presentes en el compartimento epitelial de la región central, y que podrían corresponder a macrófagos tipo M1, con capacidad tumoricida.
- La mayor densidad numérica de macrófagos estromales objetivada en el grupo hiperplasia podría favorecer el desarrollo de la inflamación crónica, mientras que la mayor densidad numérica de macrófagos epiteliales en el grupo cáncer podría hacerlo con el desarrollo tumoral, debido a la migración y diferenciación de macrófagos tipo M2 estimulada por las propias células tumorales.
- Se objetivó una mayor fracción de volumen de macrófagos estromales en el grupo cáncer, por lo que aunque la densidad numérica de macrófagos estromales no se encuentra aumentada, si lo hace el volumen que ocupan estos macrófagos, siendo de mayor tamaño.
- El estudio de conglomerados permite establecer la posible relación entre la angiogénesis, la proliferación celular, la cantidad de células epiteliales, los mastocitos periglandulares, los mastocitos totales y los macrófagos epiteliales en los distintos grupos de estudio lo que parece confirmar la implicación de macrófagos epiteliales y mastocitos periglandulares en los procesos de angiogénesis y proliferación celular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es posible concluir que la infiltración y diferenciación de células inflamatorias (macrófagos o mastocitos) en el tejido prostático, así como su distribución, tiene implicaciones en los procesos de proliferación y angiogénesis en la patología benigna y maligna prostática, así como en la predisposición de determinadas regiones de la próstata normal a la aparición de patologías concretas.

## BIBLIOGRAFÍA

---

## Bibliografía

1. Hunter DJ, Berra-Unamuno A, Martin-Gordo A. Prevalence of urinary symptoms and other urological conditions in Spanish men 50 years old or older. *J Urol*. 1996 Jun; 155(6): p. 1965-1970.
2. Cózar JM, Miñana B, Gómez-Veiga F, Rodríguez-Antolín A, Villavicencio H, Cantalapiedra A, et al. Prostate cancer incidence and newly diagnosed patient profile in Spain in 2010. *BJU Int*. 2012 Dec; 110(11 Pt B): p. E701-706.
3. Reiter MA, Pfitzenmaier J, Hohenfellner M, Haferkamp A. Immunomodulatory treatment approaches for prostate cancer. *Urologe A*. 2009 Jul; 48(7): p. 755-763.
4. Aydin O, Dusmez D, Cinel L, Doruk E, Kanik A. Immunohistological analysis of mast cell numbers in the intratumoral and peritumoral regions of prostate carcinoma compared to benign prostatic hyperplasia. *Pathol Res Pract*. 2002; 198(4): p. 267-271.
5. Johansson A, Rudolfsson S, Hammarsten P, Halin S, Pietras K, Jones J, et al. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *Am J Pathol*. 2010 Aug; 177(2): p. 1031-1041.
6. Sadler TW. Embriología médica. 7th ed.: Editorial Médica Panamericana; 1995.
7. Tanagho EA. Embryologic development of the urinary tract TP B, editor.: A.U.A.; 1982.
8. Cunha JR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins TS. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrin Rev*. 1987; 8: p. 338-362.
9. Algaba F. Bases morfológicas del desarrollo de la hiperplasia prostática. *Patología*. 1993; 26: p. 113-119.
10. Rouviere H. Anatomía humana. 10th ed. Barcelona: Masson; 1999.
11. Fawcett W. Sistema reproductor masculino. In Fawcett W. Tratado de Histología. 12th ed. Madrid: Mc.Graw-Hill Interamericana; 1995. p. 833-884.
12. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*. 1988; 12: p. 619-633.
13. McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol*. 1968; 49: p. 347-357.
14. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey FS. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histology pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol*. 1988 Dec; 12: p. 897-906.
15. Berman DM, Rodríguez R, Veltri RW. Development, molecular biology and physiology of the prostate. In Wein AJ, editor. Campbell-Walsh Urology. Philadelphia: Elsevier; 2012. p.

- 2533-2569.
16. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign hyperplasia with age. *J Urol*. 1984 Sep; 132(3): p. 474-479.
  17. McNeal J. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol*. 1978; 15(4): p. 340-345.
  18. Pardo FJ. Anatomía patológica especial. In *Anatomía patológica del sistema genital masculino*. Barcelona: Doyma; 1992. p. 739-757.
  19. Rioja LA, Sanz JI, Gil MJ, Allepuz C. Carcinoma de próstata. In *Tratado de Urología*. Barcelona: J. R. Prous Editores; 1993.
  20. Gleason DF. Classification of prostatic carcinoma. *Cancer Chemother Rep*. 1966 Mar; 50(3): p. 125-128.
  21. Brawn PN, Ayala AG, von Eschenbach AC, Hussey DH, Johnson DE. Histologic grading study of prostate adenocarcinoma: the development of a new system and comparison with other methods. A preliminary study. *Cancer*. 1982 Feb; 49(3): p. 525-532.
  22. Mostofi FK, Sesterhenn I, Sobin LH. Histological typing of prostate tumours. In *International Histologic Classification of Tumours*. Geneva: World Health Organization; 1980.
  23. Gaeta JF, Asirwatham JE, Miller G, Murphy GP. Histologic grading of primary prostatic cancer: a new approach to an old problem. *J Urol*. 1980 May; 123(5): p. 689-693.
  24. Böcking A, Kiehn J, Heinzel-Wach M. Combined histologic grading of prostatic carcinoma. *Cancer*. 1982 Jul; 50(2): p. 288-294.
  25. Gaeta JF, Englander LC, Murphy GP. Comparative evaluation of National Prostatic Cancer Treatment Group and Gleason systems for pathologic grading of primary prostatic cancer. *Urology*. 1986 Apr; 27(4): p. 306-308.
  26. Gleason DF. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In Tannenbaum M. *Urologic Pathology: The Prostate.*: Lea and Febiger; 1977. p. 171-198.
  27. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance and open questions. *Semin Immunopathol*. 2013 Sep; 35(5): p. 585-600.
  28. Fawcett DW. Sangre. In Fawcett DW. *Tratado de Histología*. 12th ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1995. p. 121-147.
  29. Fawcett DW. Tejido conjuntivo. In Fawcett DW. *Tratado de histología*. 12th ed. Madrid:

- McGraw-Hill Interamericana; 1995. p. 148-187.
30. Fawcett DW. El sistema inmunitario. In Fawcett DW. Tratado de Histología. 12th ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1995. p. 455-478.
31. Kumar V. Inflamación y reparación. In Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins. Patología Humana. (Student Consult). 9th ed. Barcelona: Elsevier; 2013. p. 29-73.
32. Crivellato E, Ribatti D. The mast cell: an evolutionary perspective. Biol Rev Camb Philos Soc. 2010 May; 85(2): p. 437-460.
33. Frenzel L, Hermine O. Mast cells and inflammation. Joint Bone Spine. 2013; 80: p. 141-145.
34. Ribatti D. Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system. J Anat. 2006; 208: p. 139-152.
35. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst. 1990 Jan; 82(1): p. 4-6.
36. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science. 1987 Jan; 23(235): p. 442-447.
37. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. The structure of the vascular network in tumors. Cancer Lett. 2007; 248: p. 18-23.
38. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971; 285: p. 1182-1186.
39. Ellis LM, Fidler IJ. Finding the tumor copycat. Therapy fails, patients don't. Nat Med. 2010; 16: p. 974-975.
40. Sokol H, Georgin-Lavialle S, Grandpeix-Guyodo C, Canioni D, Berete S, Dubreuil P, et al. Gastrointestinal involvement and manifestations in systemic mastocytosis. Inflamm Bowel Dis. 2010 Jul; 16(7): p. 1247-1253.
41. Smith JH, Butterfield JH, Pardanani A, DeLuca GC, Cutrer FM. Neurologic symptoms and diagnosis in adults with mast cell disease. Clin Neurol Neurosurg. 2011 Sept; 113(7): p. 570-574.
42. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, et al. Mast cells and inflammation. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1822: p. 21-33.
43. Tamir H, Theoharides TC, Gershon MD, Askenase PW. Serotonin storage pools in basophil leukemia and mast cells: characterization of two types of serotonin binding protein and radioautographic analysis of the intracellular distribution of serotonin. J Cell Biol. 1982; 93: p. 638-647.

44. Kandere-Grzybowska K, Letourneau R, Kempuraj D, Donelan J, Poplawski S, Boucher W, et al. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *J Immunol.* 2003; 171: p. 4830-4836.
45. Levi-Schaffer F, Shalit M. Differential release of histamine and prostaglandin D2 in rat peritoneal mast cells activated with peptides. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1989; 90: p. 352-357.
46. Ribatti D, Vacca A. Overview of angiogenesis during tumor growth. In Figg WG, Folkman J, editors. *Angiogenesis. An Integrative Approach from Science to.* New York: Springer; 2008. p. 161-168.
47. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrofage connection. *Cancer Lett.* 2008 Aug; 267(2): p. 204-215.
48. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today.* 2000 Aug; 6(8): p. 324-329.
49. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells recurrence and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: p. 203-213.
50. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006; 313: p. 1960-1964.
51. Clemente CG, Mihm Jr. MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996; 77: p. 1303-1310.
52. Gulubova M, Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Jul; 24(7): p. 1265-1275.
53. Takanami I, Takeuchi K, Kodaira S. Tumor-associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinoma: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncology.* 1999; 57(2): p. 138-142.
54. Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92: p. 6254-6258.
55. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest.* 2007; 447: p. 1116-1120.
56. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Julio; 33(7): p.

- 1478-1483.
57. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357: p. 539-545.
  58. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005; 7: p. 211-217.
  59. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006; 42: p. 717-727.
  60. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002; 23: p. 549-555.
  61. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004; 25: p. 677-686.
  62. Ehrlich P. Beiträge zur Theorie und Praxis der Histologischen Färbung Leipzig University: Thesis; 1878.
  63. Westphal E. Über Mastzellen. In Ehrlich P, editor. *Farbenanalytischen Untersuchungen*. Berlin: Hirschwald; 1891. p. 17-41.
  64. Nowak EC, Weaver CT, Turner H, Begum-Haque S, Becher B, Schreiner B, et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory. *J Exp Med*. 2009.; 206: p. 1653–1660.
  65. Feoktistov I, Ryzhov S, Glodstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis. Cooperative interaction between A2 and A3 adenosine receptors. *Circ Res*. 2003; 92: p. 485-492.
  66. Zudaire E, Martinez A, Garayoa M, Plo R, Kaur G, Woolhiser MR, et al. Adrenomedullin is a cross-talk molecule that regulates tumor and mast cell function during human carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2006; 168: p. 280-291.
  67. Acikalin MF, Oner U, Topçu I, Yasar B, Kiper H, Colak E. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assesment of colorectal carcinomas. *Dig Liver Dis*. 2005 Mar; 37(3): p. 162-169.
  68. Yodavuh S, Tangjitgamol S, Puangsa-art S. Prognostic significance of microvessel density and mast cell density for the survival of Thai patients with primary colorectal cancer. *J Med Assoc Thai*. 2008 May; 91(5): p. 723-732.
  69. Ribatti D, Finato N, Crivellato E, Marzullo A, M. D, Nico B, et al. Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathologic progression in

- human endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Dec; 193(6): p. 1961-1965.
70. Ribatti D, Crivellato E. The controversial role of mast cells in tumor growth. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009; 275: p. 89-131.
  71. Irani AMA, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. Detection of MCt and MCtc types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal antitryptase and antichymase antibodies. *J Histochem Cytochem.* 1989 Oct; 37(10): p. 1509-1515.
  72. Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, Ren S, Schwartz LB, Tonnesen MG, et al. Human mast cells stimulate vascular tube formation: tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest.* 1997 Jun; 99(11): p. 2691-2700.
  73. Conti P, Castellani ML, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Tetè S, et al. Role of mast cells in tumor growth. *Ann Clin Lab Sci.* 2007 Autumn; 37(4): p. 315-322.
  74. Mauro LV, Bellido M, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, et al. Association between mast cells of different phenotypes and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol Med Rep.* 2008 Nov-Dec; 1(6): p. 895-902.
  75. Carlini MJ, Dalurzo MC, Lastiri JM, Smith DE, Vasallo BC, Puricelli LI, et al. Mast cell phenotypes and microvessels in non-small cell lung cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol.* 2010 May; 41(5): p. 697-705.
  76. Fleischmann A, Schlomm T, Köllermann J, Sekulic N, Huland H, Mirlacher M, et al. Immunological microenvironment in prostate cancer: high mast cell densities are associated with favorable tumor characteristics and good prognosis. *Prostate.* 2009 Jun; 69(9): p. 976-981.
  77. Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jan; 1822(1): p. 2-8.
  78. Kumar V. Aparato genital masculino y vía urinaria baja. In Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins. *Patología Humana. (Student Consult).* Barcelona: Elsevier; 2013. p. 657-679.
  79. Roehrborn CG. Benign prostatic hyperplasia: etiology, pathophysiology, epidemiology and natural history. In Wein AJ, editor. *Urology.* Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 2570-2610.
  80. Robert G, Descazeaud A, Nicolaiew N, Terry S, Sirab N, Vacherot F, et al. Inflammation in benign prostatic hyperplasia: a 282 patients' immunohistochemical analysis. *Prostate.* 2009 Dec; 69(16): p. 1774-1780.
  81. Nickel JC, Roehrborn CG, O'Leary MP, Bostwick DG, Somerville MC, Rittmaster RS. The relationship between prostate inflammation and lower urinary tract symptoms: examination of baseline data from the REDUCE trial. *Eur Urol.* 2008 Dec; 54(6): p. 1379-



1384.

82. Gandaglia G, Briganti A, Gontero P, Mondaini N, Novara G, Salonia A, et al. The role of chronic prostatic inflammation in the pathogenesis and progression of benign prostatic hyperplasia (BPH). *BJU Int.* 2013 Aug; 112(4): p. 432-441.
83. Itoh M, De-Rooij D, Takeuchi Y. Mode of inflammatory cell infiltration in the testes of mice injected with syngeneic testicular germ cells without adjuvant. *J Anat.* 1995 Dec; 187(Pt 3): p. 671-679.
84. Anim JT, Udo C, John B. Characterisation of inflammatory cells in benign prostatic hyperplasia. *Acta Histochem.* 1998 Nov; 100(4): p. 439-440.
85. Papadoukakis S, Kyroudi-Voulgari A, Truss MC, Perea D, Mitropoulos D. Quantitative study of mast cells in experimentally induced benign prostatic hyperplasia. *Urol Int.* 2010 Feb; 84(1): p. 100-104.
86. Amir T, Pai RR, Raghuveer CV. Mast cell profile in prostatic lesions. *Indian J Med Sci.* 1998 Nov; 52(11): p. 507-513.
87. Aydin O, Dusmez D, Cinel L, Doruk E, Kanik A. Immunohistological analysis of mast cell numbers in the intratumoral and peritumoral regions of prostate carcinoma compared to benign prostatic hyperplasia. *Pathol Res Pract.* 2002; 198(4): p. 267-271.
88. Cózar JM, Miñana B, Gómez-Veiga F, Rodríguez-Antolín A, Villavicencio H, Cantalapiedra A, et al. Prostate cancer incidence and newly diagnosed patient profile in Spain in 2010. *BJU Int.* 2012 Dec; 110(11 Pt B): p. E701-E706.
89. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason MD, et al. Guidelines on prostate cancer Parsons KF, editor. Arnhem: EAU; 2013.
90. Steinberg GD, Carter BS, Beaty HD, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 1990; 17: p. 337-347.
91. Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH, Castro R. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol.* 2009 Apr; 55(4): p. 864-875.
92. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, et al. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol.* 2011 Jul; 60(1): p. 106-117.
93. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr; 7(4): p. 256-269.
94. Klein EA, Silverman R. Inflammation, infection, and prostate cancer. *Curr Opin Urol.* 2008

- May; 18(3): p. 315-319.
95. Halin S, Rudolfsson SH, Van Rooijen N, Bergh A. Extratumoral macrophages promote tumor and vascular growth in an orthotopic rat prostate tumor model. *Neoplasia*. 2009 Feb; 11(2): p. 177-186.
  96. Fujii T, Shimada K, Asai O, Tanaka N, Fujimoto K, Hirao K, et al. Immunohistochemical analysis of inflammatory cells in benign and precancerous lesions and carcinoma of the prostate. *Pathobiology*. 2013 Jan; 80(3): p. 119-126.
  97. Lissbrant IF, Stattin P, Wikström P, Damber JE, Egevad L, Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Onc*. 2000 Sep; 17(3): p. 445-451.
  98. Johansson A, Rudolfsson S, Hammarsten P, Halin S, Pietras K, Jones J, et al. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *Am J Pathol*. 2010 Aug; 177(2): p. 1031-1041.
  99. Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin-6. *BJU Int*. 2013 Sep; 10(doi: 10.1111/bju).
  100. Zhang J, Patel L, Pienta KJ. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Feb; 21(1): p. 41-48.
  101. Wang W, Bergh A, Damber JE. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 May; 11(9): p. 3250-3256.
  102. Kirschenbaum A, Liu X, Yao S, Levine AC. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology*. 2001 Aug; 58(2): p. 127-131.
  103. Liu XH, Kirschenbaum A, Yu K, Yao S, Levine AC. Cyclooxygenase-2 suppresses hypoxia-induced apoptosis via a combination of direct and indirect inhibition of p53 activity in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem*. 2005 Feb; 280(5): p. 3817-3823.
  104. Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, Yao S, Dosoretz A, Holland JF, et al. Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem*. 2002 Dec; 277(51): p. 50081-50086.
  105. Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, Yao S, Klausner A, Preston C, et al. Prostaglandin E(2) stimulates prostatic intraepithelial neoplasia cell growth through activation of the interleukin-6/GP130/STAT-3 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jan; 290(1): p. 249-255.
  106. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984 May; 134: p. 127-136.

107. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TS, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1988 Oct; 96(10): p. 857-881.
108. Ávila Baray HL. Introducción a la metodología de la investigación.: Edición electrónica; 2006.
109. Gómez V, Ingelmo I, Martín R, Codesal J, Rodríguez R, Pozuelo JM, et al. Effect of prolactin on the population of epithelial cells from ventral prostate of intact and cyproterone acetate-treated peripubertal rats: stereological and immunohistochemical study. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009 May; 292(5): p. 746-755.
110. Arriazu R, Pozuelo JM, Henriques-Gil N, Perucho T, Martín R, Rodríguez R, et al. Immunohistochemical study of cell proliferation, Bcl-2, p53 and caspase-3 expression on preneoplastic changes induced by cadmium and zin chloride in the ventral rat prostate. *J Histochem Cytochem*. 2006 Sep; 54(9): p. 981-990.
111. Santamaría L, Ingelmo I, Ruíz J, Teba F. Study of the distribution of microvessels in normal and pathologic prostate using an information-based similarity analysis. *J Microsc*. 2011 Sep; 243(3): p. 303-314.
112. Delesse MA. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *C.R. Hebd Séan Acad Sci*. 1847; 25: p. 544-546.
113. Ferrán Aranaz M. Análisis de conglomerados. In *SPSS para Windows, programación y análisis estadístico*. Madrid: Mc Graw Hill; 1997. p. 395-419.
114. Weibel E. Quantitation in morphology: possibilities and limits. *Beitr Pathol*. 1975 May; 155(1): p. 1-17.
115. Elias H, Hyde D. An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy). *Am J Anat*. 1980 Dec; 159(4): p. 412-446.
116. Gundersen H, Jensen E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987 Sep; 147(3): p. 229-263.
117. Santamaría-Solís L, Serna-Cuellar E, Ingelmo-Ingelmo I. Quantification of the adipose tissue by stereology. *Cir Plast Iberolatinoam*. 2013; 39(1): p. S74-S81.
118. Bartsch G. Stereology, a new quantitative morphological approach to study prostatic function and disease. *Eur Urol*. 1977; 3(2): p. 85-95.
119. Bartsch G, Rohr H. Ultrastructural stereology: a new approach to the study of prostatic function. *Invest Urol*. 1977 Jan; 14(4): p. 301-306.

120. Naoe M, Marumoto Y, Ishizaki R, Ogawa Y, Nakagami Y, Yoshida H. Correlation between major histocompatibility complex class I molecules and CD8+ T lymphocytes in prostate, and quantification of CD8 and interferon-gamma mRNA in prostate tissue specimens. *BJU Int.* 2002 Nov; 90(7): p. 748-753.
121. Duan W, Garner D, Williams S, Funckes-Shippy C, Spath I, Blomme E. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003 Feb; 199(2): p. 221-228.
122. Babinski M, Chagas M, Costa W, Pereira M. MORFOLOGÍA Y FRACCIÓN DEL ÁREA DEL LUMEN GLANDULAR DE LA ZONA DE TRANSICIÓN EN LA PRÓSTATA HUMANA. *Rev Chil Anat.* 2002; 20(3): p. 255-262.
123. Harper M, Glynne-Jones E, Goddard L, Wilson D, Matenhelia S, Conn I, et al. Relationship of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in prostatic carcinomas to various clinical parameters. *Prostate.* 1992; 20(3): p. 243-253.
124. Sulik M, Guzinska-Ustymowicz K. Expression of Ki-67 and PCNA as proliferating markers in prostate cancer. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2002; 47: p. 262-269.
125. Cappello F, Ribbene A, Campanella C, Czarnecka A, Anzalone R, Bucchieri F, et al. The value of immunohistochemical research on PCNA, p 53 and heat shock proteins in prostate cancer management: a review. *Eur J Histochem.* 2006 Jan-Mar; 50(1): p. 25-34.
126. Montironi R, Galluzi C, Diamanti L, Giannulis I, Scarpelli M, De Nictolis M. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in prostatic invasive adenocarcinoma. Is the proliferation state in the marginal zone of the tumour higher than in the central part? *Anticancer Res.* 1993 Jan-Feb; 13(1): p. 129-132.
127. McComb R, Jones T, Pizzo S, Bigner D. Specificity and sensitivity of immunohistochemical detection of factor VIII/von Willebrand factor antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* 1982 Apr; 30(4): p. 371-377.
128. Deering R, Bigler S, Brown M, Brawer M. Microvasculature in benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 1995 Mar; 26(3): p. 111-115.
129. Bigler S, Deering R, Brawer M. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol.* 1993 Feb; 24(2): p. 220-226.
130. Goebeler M, Roth J, Teigelkamp S, Sorg C. The monoclonal antibody MAC387 detects an epitope on the calcium-binding protein MRP14. *J Leukoc Biol.* 1994 Feb; 55(2): p. 259-261.
131. Ashman L, Buhning H, Aylett G, Broudy V, Müller C. Epitope mapping and functional studies with three monoclonal antibodies to the c-kit receptor tyrosine kinase, YB5.B8, 17F11, and SR-1. *J Cell Physiol.* 1994 Mar; 158(3): p. 545-554.

132. McNeal J. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*. 1981; 2(1): p. 35-49.
133. Meyer J, Sufrin G, Martin S. Proliferative activity of benign human prostate, prostatic adenocarcinoma and seminal vesicle evaluated by thymidine labeling. *J Urol*. 1982 Dec; 128(6): p. 1353-1356.

## APÉNDICE

---